

Department Biologie II
Anthropologie und Humangenetik
Ludwig-Maximilians-Universität München

Untersuchungen zur dreidimensionalen Organisation des Genoms in Säugerzellkernen



Dissertation der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Eingereicht am: 30. Juli 2008

Claudia Hepperger

Untersuchungen zur dreidimensionalen Organisation des Genoms in Säugerzellkernen

Dissertation der Fakultät für Biologie, Department II
der Ludwig-Maximilians-Universität München
vorgelegt von
Dipl. Biol. Claudia Hepperger

1. Gutachter: Prof. Dr. Thomas Cremer
2. Gutachter: PD Dr. Angelika Böttger

Tag der mündlichen Prüfung: 18.12.2008

*Das Ganze ist mehr als die Summe seiner Teile,
aber es repräsentiert sich über seine Einzelheiten.*

(Manfred Peschel)

<u>1</u>	<u>EINLEITUNG</u>	<u>1</u>
1.1	Die Architektur des Zellkerns	1
1.1.1	Bestandteile und Substrukturen des Zellkerns	1
1.1.2	Heterochromatin, Chromozentren und repetitive DNA-Elemente	2
1.1.3	Chromosomenterritorien	3
1.1.4	Genloci	3
1.1.5	Das CT-IC Modell	4
1.1.6	Anordnung der parental Genome in Säugerzellen	4
1.2	Markierung von DNA im Zellkern	9
1.3	Methoden der Zellkernfixierung	9
1.4	Ziele dieser Arbeit	10
<u>2</u>	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	<u>13</u>
2.1	Zellkultur	13
2.1.1	Verwendete Zellen	13
2.1.2	Kultivierung und Differenzierung von primären Maus-Myoblasten (PMI28)	14
2.1.3	Isolierung, Kultivierung und Wachstumshemmung embryonaler Maus-Fibroblasten (Feederzellen)	14
2.1.4	Kultivierung von embryonalen Maus-Stammzellen (ES-Zellen)	16
2.1.5	Nachweis primärer und unausdifferenzierter ES-Zellen	17
2.1.6	Unspezifische Differenzierung von ES-Zellen	20
2.1.7	Differenzierung von ES-Zellen zu Makrophagen	22
2.1.8	Nachweis vollständig differenzierter Makrophagen	24
2.1.9	Isolation von Lymphozyten aus peripherem Blut von Maultier, Pferd und Esel	27
2.2	Transfektion von mES-Zellen	29
2.2.1	Verwendete Plasmide	29
2.2.2	Klonierung des Plasmids pLys-8.8	31
2.2.3	Transfektionsmethoden	34
2.2.4	Transfektionsansätze und Selektion der Klone	36
2.2.5	Nachweis der Integration von Plasmiden	37

2.3 Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH) und Antikörperrnachweis	40
2.3.1 Gewinnung der DNA-Sonden	41
2.3.2 Markierung der DNA-Sonden	48
2.3.3 Herstellung von Maus-C ₀ t1-DNA aus genomischer DNA	50
2.3.4 Herstellung von Metaphasechromosomen-Präparaten (2D)	51
2.3.5 2D-Fixierung von Interphasekernen nach W. Bickmore	54
2.3.6 Fixierung und Permeabilisierung von Zellen für 3D-FISH	55
2.3.7 Herstellung der Hybridisierungsmixe	56
2.3.8 Hybridisierung auf 2D- und 3D-Präparate	58
2.3.9 Detektion der FISH-Signale	59
2.3.10 Kombination von FISH mit BrdU-Nachweis oder Immunofluoreszenz	60
2.3.11 Antikörperrnachweis von Splicing Speckles	62
2.4 RT (Reverse Transkriptase) - PCR	62
2.4.1 RNA-Isolation	63
2.4.2 Photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration	64
2.4.3 Kontrolle der RNA-Isolation mittels Gelelektrophorese	64
2.4.4 Erststrang-cDNA Synthese	65
2.4.5 Primerdesign	66
2.4.6 Genspezifische PCR	69
2.4.7 Gelelektrophorese der cDNA-Amplifikate	69
2.5 Mikroskopie	70
2.5.1 Durchlicht- / Phasenkontrastmikroskopie	70
2.5.2 Epifluoreszenzmikroskop	70
2.5.3 Inverses Fluoreszenzmikroskop	71
2.5.4 Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop (LSM)	71
2.6 Bildverarbeitung	73
2.6.1 Bildbearbeitung und Shift-Korrektur	73
2.6.2 3D-Rekonstruktion aus Bildstapeln	74
2.7 Quantitative Auswerteverfahren	74
2.7.1 Auszählen von Signalclustern in Maultierzellen	74
2.7.2 3D-RRD (Relative Radial Distribution)	75
2.7.3 EDMT (Enhanced Distance Measurement Tool)	75
2.7.4 Normalisierung der Signalverteilung und Kerngröße	76
2.7.5 Objektzählprogramm	77

2.8	Statistische Auswertung	77
2.8.1	Vergleich normalisierter Verteilungen	77
2.8.2	Berechnung von p-Werten	77
2.8.3	Berechnung des Anteils repetitiver Elemente eines Genlocus	78
2.8.4	Pearson-Korrelationskoeffizient	78
3	<u>ERGEBNISSE</u>	79
3.1	Transfektion differenzierungsfähiger Mauszellen mit dem lac-Operator/lac-Repressor-GFP System	79
3.1.1	Neuklonierung, Sequenzierung und Transfektion des lac-Operator Plasmids pLys-8.8	80
3.1.2	Transfektion muriner ES-Zellen	82
3.2	Konservierung der dreidimensionalen Chromatinstruktur in FISH-Experimenten	84
3.2.1	Konservierung der Kernform	84
3.2.2	Konservierung der Chromozentrenstruktur	85
3.2.3	Konservierung der Struktur und Position von Chromosomenterritorien und Genen	86
3.3	Dreidimensionale Genpositionierung in Mauszellkernen	89
3.3.1	Anordnung von Genloci und Chromosomenterritorien innerhalb des Zellkerns	91
3.3.2	Anordnung von Genloci innerhalb des Chromosomenterritoriums	92
3.3.3	Genpositionen können je nach Zelltyp variieren	99
3.3.4	Genpositionierung korreliert nicht mit der lokalen Gendichte	101
3.3.5	Genpositionierung korreliert mit dem GC-Gehalt und einigen repetitiven Elementen	103
3.3.6	Genposition und Expression	106
3.3.7	Splicing Speckles	107
3.4	Räumliche Verteilung der elterlichen Genome am Beispiel des Hybriden <i>E. caballus</i> × <i>E. asinus</i> (Maultier)	108
3.4.1	Hybridisierung auf Metaphasechromosomen	108

3.4.2	2D-FISH auf Interphasekernen deutet auf eine zufällige Verteilung maternaler und paternaler Chromosomen hin	111
3.4.3	Dreidimensionale Verteilung maternaler und paternaler Chromosomen	112
3.4.3.1	Keine feststellbare Genomseparation maternaler und paternaler Interphasechromosomen	114
3.4.3.2	Gleichmäßige Verteilung maternaler und paternaler Chromosomen während der Mitose	118
3.4.3.3	Zentromere beider parentalen Genome bilden gemeinsame Cluster	119
3.4.3.4	Repetitive Elemente von Pferd und Esel sind häufig GC-reich	121

4 DISKUSSION 122

4.1 Keine stabile Etablierung des lac-Operator/lac-Repressor-GFP Systems in murinen ES-Zellen 122

4.2 Bestmöglicher Erhalt der 3D-Zellkernstruktur mittels Paraformaldehyd-Fixierung 124

4.3 Genpositionierung in Mauszellen 126

4.3.1	Polare Organisation der Chromosomenterritorien	126
4.3.2	Der β -Globin-Locus assoziiert mit peripherem, nicht jedoch mit zentromerischem Heterochromatin	127
4.3.3	Position des stammzellspezifischen Transkriptionsfaktors Oct3/4 in Bezug auf das Chromosomenterritorium	127
4.3.4	Radiale Positionierung der Genloci in Abhängigkeit von Zelltyp und Expression	128
4.3.5	Genpositionierung in Abhängigkeit lokaler genomischer Eigenschaften	128
4.3.6	Interaktionsmodell der Positionierung von Chromatin im Zellkern	130

4.4 Keine parentale Genomseparation in Maultierzellen 131

5 ZUSAMMENFASSUNG 134

6 ANHANG 136

7 LITERATUR 137

<u>8</u>	<u>DANKSAGUNG</u>	<u>151</u>
<u>9</u>	<u>CURRICULUM VITAE</u>	<u>152</u>
<u>10</u>	<u>PUBLIKATIONEN</u>	<u>153</u>
<u>11</u>	<u>EHRENWÖRTLICHE VERSICHERUNG</u>	<u>154</u>

1 Einleitung

1.1 Die Architektur des Zellkerns

Vor einigen Jahren, im Jahr 2001, wurden die Ergebnisse des öffentlich geförderten Humangenomprojekts vorgestellt und damit die Abfolge von rund drei Milliarden Basenpaaren des menschlichen Erbmaterials beschrieben (Lander 2001; Venter 2001). Seither wurden die Genome zahlreicher Organismen entschlüsselt, u.a. das der Maus (Waterston 2002). Bis heute konnte die Zuweisung von Funktionen einzelner DNA-Abschnitte die Sequenzierung nicht einholen. Zudem können Vorgänge spezifischer Genaktivierung und -inaktivierung einer Zelle nicht ausschließlich auf der Sequenzebene erklärt werden. Neben molekularen Faktoren, die direkt an die DNA binden, sind in letzter Zeit verstärkt epigenetische Faktoren wie DNA-Methylierung (Fraga 2005) (Übersicht s.: Egger 2004; Fuks 2005), Histon-Modifikationen (Martens 2005; Zinner 2006; Zinner 2007) (Übersicht s.: Jenuwein 2001; Kouzarides 2007), sowie die räumliche Organisation des Chromatins im Zellkern (Meaburn 2007b) (Übersicht s.: Kosak 2004; Foster 2005; Cremer 2006b; Fraser 2007; Lanctôt 2007a; Misteli 2007) als potentielle Mittel der Genomregulierung in den Blickpunkt gerückt. Um diese Art der Regulierung und somit die funktionelle Zellkernarchitektur (Übersicht s.: Taddei 2004; Misteli 2005) zu verstehen ist es notwendig, die hochorganisierte, dreidimensionale Verteilung des Genoms im Zellkern zu kennen.

In der grundlegenden Organisation und der Anzahl ihrer Gene (< 30.000) unterscheiden sich Maus und Mensch relativ geringfügig, auch wenn sich ihre Abstammungslinien bereits vor ca. 75 Millionen Jahren trennten und das Genom der Maus mit 2500 Mb etwas kleiner ist als das des Menschen mit 2900 Mb. Trotz zahlreicher Umbauten und Divergenzen auf Sequenzebene, können 90% des Maus- und Menschengenoms in Bereiche konservierter Syntenie unterteilt werden (Alberts 2005) und zu etwa 80% der Proteine der Maus gibt es beim Menschen genau (1:1) orthologe Gegenstücke (Strachan 2005). Viele adulte Mauszelltypen und besonders ES-Zellen der Maus können im Gegensatz zu den menschlichen Äquivalenten relativ leicht isoliert und aufgrund geringerer ethischer und gesetzlicher Restriktionen kultiviert bzw. differenziert werden. Sie eignen sich gut als Modelle zur Untersuchung der Organisation von DNA in verschiedenen Zelltypen und wurden deshalb in der vorliegenden Arbeit hauptsächlich verwendet.

1.1.1 Bestandteile und Substrukturen des Zellkerns

Der Nukleus ist durch eine doppelte Membran vom Cytoplasma der Zelle abgetrennt. Darunter findet sich eine Struktur aus parallel angeordneten Intermediärfilamenten, die sogenannte **Lamina**. Das **Chromatin** beansprucht, abhängig vom Zelltyp, einen großen Teil des Kernvolumens. Die DNA ist zusammen mit den Histonproteinen in Form von Nukleosomen organisiert, welche eine 30 nm Faser bilden. Diese Struktur besitzt weitere, höhere Organisationsebenen, die jedoch noch nicht vollständig erforscht sind. Des Weiteren enthält der Kern ein oder mehrere **Nukleoli**, welche die Synthese der Ribosomen ermöglichen (Übersicht s. Scheer 1999). Sie werden an den NORs (nucleolus organizing regions) bestimmter Chromosomen und deren ribosomaler Gene gebildet. Bei der Maus handelt es sich dabei um die Chromosomen 12, 15, 16, 17, 18 und 19 (Longo 2003). Ein weiterer Bestandteil des Kerns sind die SFC (splicing-factor compartments), auch **Splicing Speckles** genannt. Sie enthalten die für das Spleißen der prä-mRNA notwendigen Faktoren (Übersicht s. Misteli 2000). **Cajal bodies** sind an der Biosynthese katalytisch aktiver snRNPs und an der posttranskriptionalen Modifikation assemblierender, spleißosomaler snRNAs beteiligt (Übersicht s. Carmo-Fonseca 2002). **PML bodies**

spielen eine Rolle bei der Regulierung der Transkription und der Bindung von Kernproteinen (Übersicht s. Spector 2001).

1.1.2 Heterochromatin, Chromozentren und repetitive DNA-Elemente

In der Interphase liegt Chromatin unterschiedlich stark kondensiert vor. Man spricht von locker gepacktem, transkriptionell aktivem **Euchromatin** und inaktivem, stark kondensiertem **Heterochromatin**. Dabei unterscheidet man konstitutives und fakultatives Heterochromatin (Übersicht s. Craig 2005). Fakultatives Heterochromatin ist gewebe- und entwicklungsspezifisch kondensiertes Chromatin. Konstitutives Heterochromatin ist dauerhaft kondensiertes Chromatin aus tandemrepetitiven Sequenzen, das sich hauptsächlich nahe Telomeren und Zentromeren befindet. Zentromerisches Chromatin mehrerer Chromosomen kann sich dabei zu sogenannten **Chromozentren** zusammenlagern (Weierich 2003), deren Anzahl und Größe je nach Zelltyp variiert (Solovei 2004; Mayer 2005). In Mauszellen können Chromozentren aufgrund ihres hohen AT-Gehalts mittels DAPI-Färbung sichtbar gemacht werden.

Die DNA-Sequenzen aller Organismen enthalten verschiedene repetitive Elemente. Die Wiederholungseinheiten können dabei unterschiedlich groß sein, von lediglich zwei aufeinanderfolgenden Basen bis zu mehreren Kilobasen. Sehr häufig sind GC-reiche Sequenzen wie die sogenannten **CpG-Inseln**, welche vermehrt in den R-Banden der Chromosomen zu finden sind (Saccone 2001) (Übersicht s. Craig 1993) und mit hoher Gendichte (Larsen 1992), Genaktivität (Selig 1992), früher Replikation (Woodfine 2004) und vermehrter Histonacetylierung in Zusammenhang gebracht werden. Bei der Maus beträgt die Anzahl der CpG-Inseln ~15.000 (ohne Wiederholungssequenzen) bei einem GC-Gehalt des gesamten Genoms von 42%, verglichen mit ~27.000 CpG-Inseln und 41% GC-Gehalt beim Menschen (Strachan 2005). Im Gegensatz dazu sind AT-reiche G-Banden eher mit geringer Gendichte, später Replikation und geringer Histonacetylierung assoziiert. Diese Zusammenhänge sind jedoch nicht zwingend und auch vom Zelltyp abhängig. Die Zuordnung einzelner Genloci kann davon stark abweichen. Eine andere Form repetitiver Elemente stellen die sogenannten „interspersed elements“ dar, die entsprechend ihrer Länge in SINEs (short interspersed elements) und LINEs (long interspersed elements) eingeteilt werden (Alberts 2005). SINEs und LINEs gehören zu den nicht-LTR-Elementen (Übersicht s. Dewannieux 2005). Zusammen können sie über 30% Prozent des gesamten Genoms repräsentieren und spielen eine Rolle bei der Evolution, Struktur und Transkription von Genen (Santangelo 2007). **SINEs** sind typischerweise zwischen 100 und 400 bp lang, innerhalb des Genoms relativ frei verteilt und oft wiederholt. Häufig sind sie GC-reich und finden sich in R-Banden (Korenberg 1988) bzw. dem Euchromatin. Es handelt sich dabei um ursprüngliche Retrotransposons, die in einigen Fällen noch immer für kleine RNAs codieren (Capy 1997). Bei der Maus unterscheidet man B1-Elemente, welche wie die Alu-Sequenzen der Primaten von der 7SL-RNA abstammen, B2 B4, und IDs, welche sich als cDNA-Kopien aus tRNA-Genen ableiten (Strachan 2005), sowie MIRs (mammalian-wide interspersed repeats). **LINEs** sind 6 bis 8 kb lange, häufig wiederholte und relativ frei verteilte DNA-Sequenzen im Genom. Sie gehören ebenfalls zu den transposablen Elementen (Übersicht s. Deininger 2002). Sie finden sich vor allem in AT-reichen Regionen im Euchromatin. In der Maus unterscheidet man u.a. LINE-1, LINE-2 und L3/CR1. Als **LTR** (long terminal repeat) bezeichnet man 200 bis 600 bp lange Wiederholungseinheiten, die bestimmte Gene flankieren und diese nach dem Herausschneiden zur Reintegration ins Genom befähigen. Sie enthalten die für die Genexpression notwendigen Sequenzen (Eickbush 2008).

1.1.3 Chromosomenterritorien

Während der Interphase besetzen Chromosomen einen begrenzten Bereich im Nukleus, das sogenannte Chromosomenterritorium (Cremer 2001a; Cremer 2006b; Meaburn 2007b). Eine nicht-zufällige Verteilung von Chromosomenterritorien wurde für Nuklei menschlicher Zellen (Croft 1999; Cremer 2001a; Bolzer 2005; Wiblin 2005), für Primaten (Tanabe 2002; Neusser 2007), Mäuse (Parada 2004; Mayer 2005) und Hühner (Habermann 2001; Stadler 2004) beschrieben. In kugelförmigen Lymphozytenkernen des Menschen und anderer Primaten befanden sich genreiche Chromosomenterritorien signifikant häufiger im Zentrum und genarme in der Peripherie des Kerns (Croft 1999; Bartova 2001; Boyle 2001; Cremer 2001a; Neusser 2007). In flachen Fibroblasten hingegen wurden Chromosomen zusätzlich nach der Größe sortiert, wobei große bevorzugt der Peripherie und kleine dem Kerninneren zugewandt waren (Cremer 2001a; Bolzer 2005). In Hühnerzellen befanden sich die kleinen, genreichen Chromosomen im Zentrum und die großen, genarmen in der Peripherie (Habermann 2001; Stadler 2004).

Mauschromosomen zeigen vergleichsweise wenig Variabilität bezüglich Größe (61-195 Mb verglichen mit 47-245 Mb des Menschen) und Gendichte (7,5-15,9 Gene/Mb verglichen mit 3,5-23 Genen/Mb des Menschen; alle Werte ohne Berücksichtigung des Y-Chromosoms aus: Ensembl Genome Browser, www.ensembl.org), was eine weniger deutliche Sortierung vermuten lassen könnte. Trotz kleiner Unterschiede konnte jedoch gezeigt werden, dass gendichtegenau wie größenabhängige Sortierung von Chromosomenterritorien in sechs untersuchten Zelltypen vorkommt: ES-Zellen, Makrophagen, Lymphozyten, Fibroblasten, Myoblasten und Myotuben (Mayer 2005). Dennoch existieren auch signifikante Unterschiede bezüglich der radialen Verteilung in verschiedenen Zelltypen (Parada 2004; Mayer 2005; Wiblin 2005). Die Gründe für diese Unterschiede sind weiterhin unklar. Eine Möglichkeit wäre expressionsabhängige Positionierung in Verbindung mit zelltypspezifischem Expressionsverhalten.

1.1.4 Genloci

Die Positionierung einzelner Genloci ist ebenfalls nicht zufällig, sondern von vielen Faktoren abhängig. Arbeiten über Gene und stabil integrierte Transgene in Hamster- und Mauszellen beschrieben Fälle, in denen die Positionierung im Kern von der Expression abhing. Dabei lagen exprimierte Loci weiter innen als inaktive (Tumbar 2001; Lukasova 2002; Chuang 2006). Besonders deutlich wird dies bei Genen mit monoallelischer Expression, wenn beide Gene eine unterschiedliche Topologie aufweisen (Dietzel 1999; Takizawa 2008). Bei endogenen Genloci von Mensch und Maus wurden Neupositionierungen aufgrund von Differenzierung und/oder transkriptioneller Aktivierung beschrieben. Beispielsweise wurde eine Assoziation bestimmter inaktiver Gene mit zentromerischem Heterochromatin festgestellt, die durch Aktivierung des Gens aufgehoben wurde (Brown 1997; Merkenschlager 2004). Bewegungen aktiver Gene weg von peripherem Heterochromatin (Kosak 2002; Zink 2004; Williams 2006) und in das Zentrum des Kerns (Takizawa 2008) wurden beobachtet. Jedoch wurde auch bei Genen in der Kernperipherie über Expressionsaktivität berichtet (Nielsen 2002; Ragoczy 2006). Eine Studie zeigte sogar anhaltende Transkription eines an die Kernlamina gebundenen Transgens (Kumaran 2008).

Positionsänderungen können sich auch auf die entsprechenden Chromosomenterritorien beziehen (Volpi 2000; Williams 2002; Chambeyron 2004). So wurde beschrieben, dass aktiv exprimierte Gene sich eher an deren Oberfläche befinden (Dietzel 1999; Volpi 2000), oder gar aus einem Territorium herausragen (Foster 2005; Sproul 2005), wie z.B. *c-myc* (Übersicht s. Bartova 2006), die Hoxgene (Chambeyron 2005), die BWS (Beckwith-Wiedemann-Syndrom) - assoziierte Region (Mahy 2002a), der MHC- (Volpi 2000) oder der EDC-Komplex (Williams

2002). Jedoch muss transkriptionelle Aktivität nicht notwendigerweise an der Oberfläche des Chromosomenterritoriums stattfinden (Mahy 2002a; Stadler 2004; Küpper 2007). Einige Studien über endogene humane Gene konnten überhaupt keinen Zusammenhang zwischen Expressionsstatus und radialer Positionierung finden. Sie folgerten daraus eine genspezifische Positionierung unabhängig von der Genaktivität (Meaburn 2008). Manche beschrieben stattdessen eine Korrelation der radialen Position eines Genlocus mit der lokalen Gendichte innerhalb eines genomischen 2 oder 10 Mb Fensters (Murmman 2005; Küpper 2007). Eine der Arbeiten verglich zusätzlich die radiale Verteilung von gepoolten Genloci mit dem GC-Gehalt und fand einen Zusammenhang zwischen Gendichte und hohem GC-Gehalt mit einer vorzugsweise internen Positionierung (Küpper 2007).

1.1.5 Das CT-IC Modell

Aus den Forschungsergebnissen der letzten Jahre hat sich eine detaillierte Modellvorstellung von der Organisation im Interphasezellkern entwickelt (Cremer 2001b; Albiez 2006). In diesem Modell enthält der Kern neben dem Chromatin in Form von Chromosomenterritorien (CT) auch chromatinfreie Räume, das sogenannte Interchromatin Compartment (IC). Man spricht deshalb vom CT-IC Modell (Abb. 1). Das Chromatin der CT ist in ~1Mb großen Domänen, sogenannten subchromosomalen Foci organisiert, die zu bestimmten Zeiten replizieren (Jackson 1998; Berezney 2000). Diese Subdomänen bleiben während eines Zellzyklus und sogar über mehrere Zellzyklen hinweg als individuelle Einheiten erhalten (Zink 1999; Koberna 2005). Das IC erstreckt sich nach dieser Modellvorstellung zwischen den Subdomänen der CT und durchzieht sie netzförmig in feinen Kanälen von bis zu wenigen Nanometern (Visser 2000; Dehghani 2005; Albiez 2006). Durch die feine Verzweigung des IC können transkribierte Gene sowohl im Inneren als auch an der Oberfläche der Territorien liegen (Verschure 1999; Dundr 2001; Bartova 2002). Aus den CT heraus können bis zu mehrere Mb große Chromatinbereiche Loops bilden (Volpi 2000). Somit bekommen die darauf liegenden Gene Zugang zum Interchromatinbereich und folglich zu den „nuclear bodies“ bzw. der Maschinerie für DNA-Replikation, Reparatur, Transkription und Spleißen (Shopland 2003). Die DNA im Übergangsbereich zwischen der Oberfläche subchromosomaler Domänen und dem IC bezeichnet man als Perichromatin Region (PR) (Übersicht s. Fakan 2007). Die DNA im Interphasenuklear unterliegt dabei nicht nur sogenannten „large scale movements“ ganzer Chromosomenterritorien und zufälligen Brownschen Bewegungen, sondern auch kleinräumigen Bewegungen innerhalb subchromosomaler Regionen (Übersicht s. Zink 1998). Dabei kann es sich um gerichtete, dynamische Positionierung von DNA-Abschnitten und Genen in Abhängigkeit von deren Transkriptionsstatus handeln.

1.1.6 Anordnung der parental Genome in Säugerzellen

Neben der Positionierung von Genen und Chromosomenterritorien ist möglicherweise auch die allgemeine Anordnung mütterlichen und väterlichen Erbmaterials von Bedeutung. Ob vom Vater und von der Mutter geerbte Chromosomen in Interphasekernen getrennte Bereiche einnehmen, fragte man sich bereits vor über 110 Jahren, kurz nach der Entdeckung der Chromosomen selbst. Häcker (1895) vermutete eine Unabhängigkeit der beiden Genome, nachdem er beobachtet hatte, dass die Zellkerne von Cyclops (Crustacea) in Form zweier Lappen organisiert sind (Abb. 2a, links). Ähnliche Schlüsse zogen Rückert (1895) und Conklin (1901) (Abb. 2a, rechts).

Heute weiß man, dass eine räumliche Trennung parental Genome in einer Reihe von Pflanzenhybriden existiert (Leitch 1991; Bennett 1992; Lima-Brito 1996). Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung mit gesamtgenomischer DNA der elterlichen Spezies zeigte getrennte Bereiche mütterlicher und väterlicher Chromosomen sowohl in der Mitose, als auch in Interphasekernen

(Abb. 2d) (Leitch 1991). Im Gegensatz dazu lagern sich die homologen Chromosomen mancher Insekten wie *Drosophila melanogaster* schon während der Embryonalentwicklung in unmittelbarer Nachbarschaft aneinander (Fung 1998). Diese Zusammenlagerung schließt eine Trennung der elterlichen Genome aus.

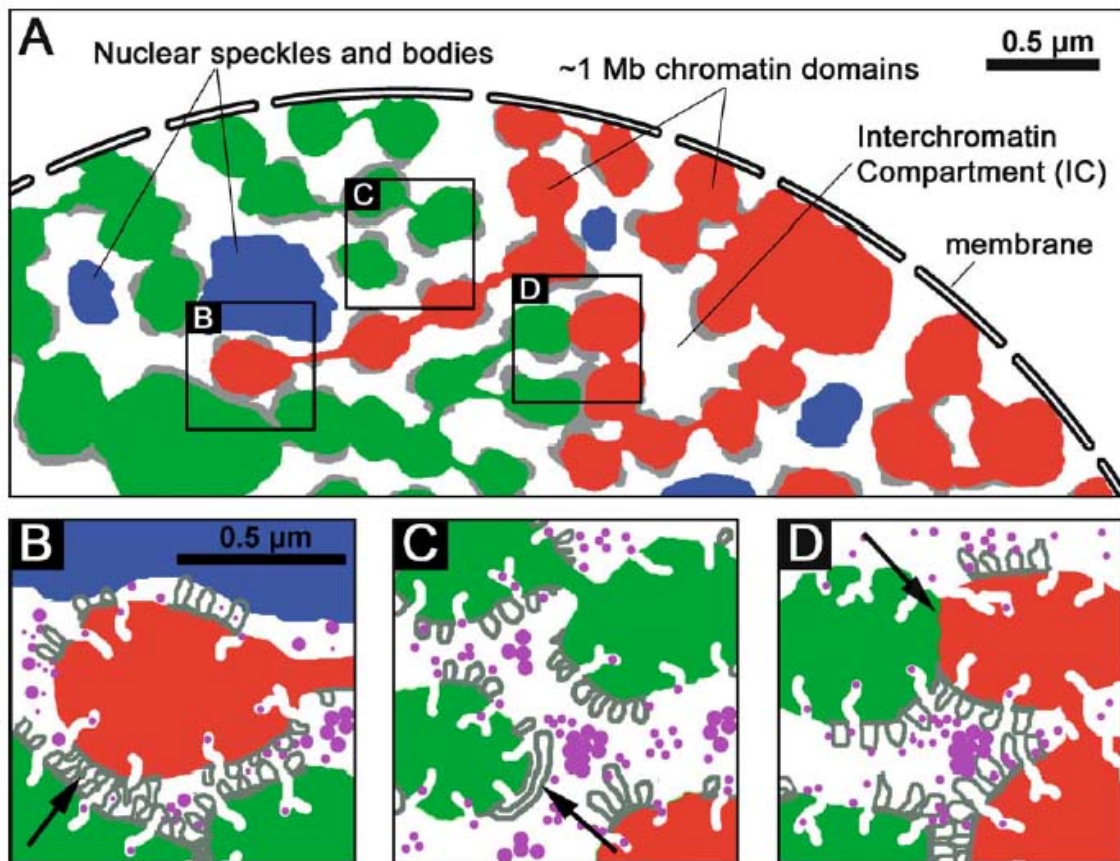


Abb. 1: Das CT-IC Modell (chromosome territory - interchromatin compartment) aus Albiez et al. (2006): A) Schematische Darstellung eines Ausschnitts aus einem Interphasezellkern. Gezeigt sind 1 Mb Domänen und höher organisierte bzw. kondensierte Strukturen zweier benachbarter CT (rot und grün), umgeben vom IC (weiß). Das IC erstreckt sich zwischen diesen Domänen in Form von Verzweigungen mit einem Durchmesser in der Größenordnung von Mikrometern bis zu einigen Nanometern. Im IC eingebettet liegen Cluster von Kernproteinen, sogenannte „speckles“ und „nuclear bodies“ (blau), die im direkten Kontakt mit den Chromatindomänen stehen können. Die Perichromatin-Region (PR) an der Peripherie der Domänen ist grau dargestellt und enthält sowohl transkriptionsbereite als auch aktiv transkribierte Gene. B) Ende einer Ausstülpung („loop“) aus dem roten Territorium, welche in das benachbarte, grüne CT hineinragt. Das IC umgibt die CT und ragt auch in diese hinein. Lokal dekondensierte Chromatinschleifen mit transkriptionsbereiten Genen bilden die PR. Diese kann im engen Kanal des IC in direktem Kontakt mit „nuclear bodies“ oder mit der PR eines benachbarten CT stehen (siehe Pfeil), um sich die Faktoren der Transkriptions- und Splicingmaschinerie (lila) zu teilen. C) Bereich mit breiteren Kanälen des IC, in dem die dekondensierten Chromatinschleifen der PR frei diffundieren können (siehe Pfeil). So können sich die Gene desselben oder auch verschiedener Chromosomen im IC für eine gemeinsam regulierte Transkription zusammenlagern. D) Direkter Kontakt (siehe Pfeil) zwischen zwei Domänen benachbarter CT. In welchem Maß sich dabei das Chromatin der beiden CT vermischt ist nicht bekannt.

Eine homologe Assoziation wie sie bei *Drosophila* beobachtet wurde, kann für Säugerzellen ausgeschlossen werden, da zahlreiche Studien mittels FISH zwei distinkte Chromosomenterritorien in Interphasekernen fanden. Bis heute liegen keine schlüssigen Daten bezüglich Genomseparation in Säugerzellen vor. Jedoch gibt es einige Daten, die für eine Genomseparation sprechen. Diese können zu drei Gruppen zusammengefasst werden: (1) Beweise für eine Genomseparation im sehr frühen Embryo. (2) Daten, die zeigen, dass Zellen zumindest in einigen Fällen ein haploides Genom aussortieren können. (3) Zwei Beschreibungen einer Genomseparation in adulten Zellen.

Genomseparation im sehr frühen Embryo

Eine der ersten experimentellen Studien über Genomseparation wurde 1904 von Moenkhaus (1904) durchgeführt. Er untersuchte Hybriden zweier Fischarten, eine mit großen und eine mit kleinen Chromosomen, und beobachtete deren räumliche Verteilung während der Mitose. Er fand eine Separation der Chromosomen während der ersten und zweiten Mitose nach der Befruchtung (Abb. 2b) und eine Vermischung in späteren Stadien.

Die Darstellung eines einzeln markierten, elterlichen Genoms in Interphasenuklei gelang Odartchenko und Keneklis im Jahr 1973 (Odartchenko 1973). Sie injizierten radioaktives Thymidin in männliche Mäuse, was radioaktiv markierte Spermien in diesen Tieren zur Folge hatte. Nach der Befruchtung unmarkierter Eizellen mit diesen Spermien, wurden die daraus entstandenen Zwei- und Vierzell-Embryos untersucht. Mittels Autoradiographie konnte gezeigt werden, dass das radioaktive Genom nur einen Teil des Nukleus einnimmt. Elterliche Genome früher Mausinterphasen liegen demnach getrennt vor, wie bereits von Moenkhaus beschrieben. Diese Ergebnisse wurden später mit einer besseren optischen Auflösung anhand von BrdU-markiertem Sperma bestätigt (Mayer 2000a).

Die Untersuchung elterlicher Genome gestaltet sich allgemein schwierig, weil eine Unterscheidung väterlicher und mütterlicher Chromosomen innerhalb einer Art mit gegenwärtigen Techniken nicht möglich ist. Im Gegensatz zu Pflanzen ist in Säugetieren die Kreuzung zweier Spezies nur zwischen nah verwandten Arten möglich. FISH-Sonden, die aus einem der beiden Elterng Genome hergestellt werden und auf „single copy“-Sequenzen von beispielsweise Chromosomen oder BAC-Klonen binden, führen deshalb auch zu vergleichbaren Signalen auf der DNA der zweiten Spezies. Diese Form der Kreuzhybridisierung nutzt man bei vergleichender Zytogenetik in Zoo-FISH Studien (Übersicht s. Wienberg 2005). Dagegen entwickeln sich repetitive Sequenzen wesentlich schneller und weisen sogar zwischen nah verwandten Spezies signifikante Unterschiede auf. Haaf und Mitarbeiter untersuchten Hybriden der beiden Mausspezies *Mus musculus* und *Mus spretus* (Mayer 2000a). Sie benutzten gesamtgenomische DNA beider Elternspezies als FISH-Sonden unter Bedingungen, bei denen nur repetitive Sequenzen hybridisieren und zu sichtbaren Signalen führen. Maternale und paternale Zentromere konnten somit getrennt voneinander dargestellt werden (Abb. 2e-g). Sie detektierten damit erneut Genomseparation im frühen Mausembryo (Abb. 2e). Nach dem Achtzell-Stadium ging diese Trennung allmählich verloren. In einer anderen Studie zeigten Hybridzellen aus Mensch und Hamster ebenfalls Genomseparation (Brandriff 1991), bis die Entwicklung dieser Zellen nach dem Zweizell-Stadium endete.

Fälle von Separation haploider Genome in adulten Zellen

In den letzten fünf Jahrzehnten wurden einige Studien publiziert, die zumindest in Ausnahmesituationen die Isolierung eines haploiden Genoms oder gar speziell der mütterlichen und väterlichen Chromosomen in somatischen Zellen beschrieben. Bereits in den fünfziger Jahren beschrieb Gläss eine „Genomsonderung“ in Metaphasespreitungen aus Rattenlebergewebe

(Gläss 1956, 1957). Er kam zu dem Schluss, dass zwei haploide Genome in einer solchen Spreitung mittels einer einfachen Linie getrennt werden könnten (Abb. 2c). Er beschrieb auch Metaphasen, die nur einen haploiden Chromosomensatz enthalten. Dies wurde 1973 von Pera und Rainer anhand von Fibroblasten der Mausspezies *Microtus agrestis* ebenfalls beschrieben (Pera 1973). In Spreitungen eines männlichen Tieres ($2n = 50, XY$) fanden sie 25,X und 25,Y Sätze, sowie triploide Zellen mit 75 Chromosomen. Ein haploider Karyotyp wurde auch in humanen Osteosarkomzellen gefunden (Übersicht s. Bridge 1997). Angenommen, diese Studien basieren nicht auf Artefakten, so muss es einen Mechanismus geben, der einen elterlichen, haploiden Chromosomensatz erkennt. Diese Fähigkeit wäre auch die Voraussetzung für eine potentielle Genomseparation in diploiden Zellen.

Mittels einiger gut etablierter Experimente wurde bei Amphibien und Fischen bewiesen, dass eine Trennung parental Genome in Zellen prinzipiell möglich ist. In einigen Fällen sind interartliche Hybriden in der Lage, das haploide Genom eines Elternteils zu eliminieren und Keimzellen mit dem vollständigen haploiden Genom des anderen Elternteils zu produzieren. Man spricht dabei von Hybridogenese. Beispiele dafür sind Froschhybriden mit dem Wasserfrosch *Rana esculenta* (Spolsky 1984; Guerrini 1997) und der Fisch *Poeciliopsis monacha* × *lucida* (Quattro 1991). Bei der Krötenart *Bufo viridis* wurde eine triploide Population beschrieben, in der die Männchen noch vor der einsetzenden Meiose ein haploides Genom eliminierten (Stöck 2002).

Chaudhuri und Mitarbeiter interpretierten Beobachtungen auf FISH-Präparaten humaner Blut-, Knochen- und Fruchtwasserzellen als Beweis für parentale Genomseparation (Chaudhuri 2003). Eine Folgestudie (Chaudhuri 2005) beschreibt ein sogenanntes „biphasisches“ Muster in einem kleinen Teil der untersuchten Blutzellen. Dabei zeigten zwei Regionen des Nukleus eine unterschiedlich intensive DNA-Gegenfärbung mit DAPI. Wurden mittels FISH Loci auf homologen Chromosomen nachgewiesen, so befand sich eines der beiden Signale stets in der stark angefärbten Region und das andere außerhalb. Dies führte zu der Schlussfolgerung, dass zwei haploide Genome unterschiedlich stark kondensieren. Auch wenn hier und in früheren Studien haploide Genome nicht zwangsläufig den mütterlichen oder väterlichen Chromosomensatz repräsentieren, schien das den Autoren am wahrscheinlichsten.

In einer der bekanntesten Studien und deren Nachfolgearbeiten, die eine Separation haploider Genome befürworten, wurde eine präzise, antiparallele Anordnung von Chromosomen in der Prophaserosette und ebenso in Interphasekernen humaner Zellen beschrieben (Nagele 1995; Nagele 1998; Nagele 1999). Obwohl eine solche Positionierung von Chromosomen von zahlreichen anderen Gruppen widerlegt wurde (Allison 1999; Cornforth 2002; Bolzer 2005; Mayer 2005), blieb die Frage, ob eine Separation elterlicher Genome existiert oder nicht, dennoch ungeklärt.

Direkte Visualisierung der Genomseparation in adulten Säugerzellen

Die oben bereits erwähnte Studie von W. Mayer und Mitarbeitern über Maushybriden untersuchte auch adulte Fibroblasten (Mayer 2000a). Für diese wurde eine deutliche Trennung der Zentromere unterschiedlicher parental Herkunft in 5 bis 10% der Fälle beschrieben (Abb. 2f). In einer Folgestudie (Mayer 2000b) wurde die Spermatogenese hybrider Mäuse untersucht. In späten Spermatidnuklei clusterten maternale und paternale Zentromere getrennt voneinander (Abb. 2g).

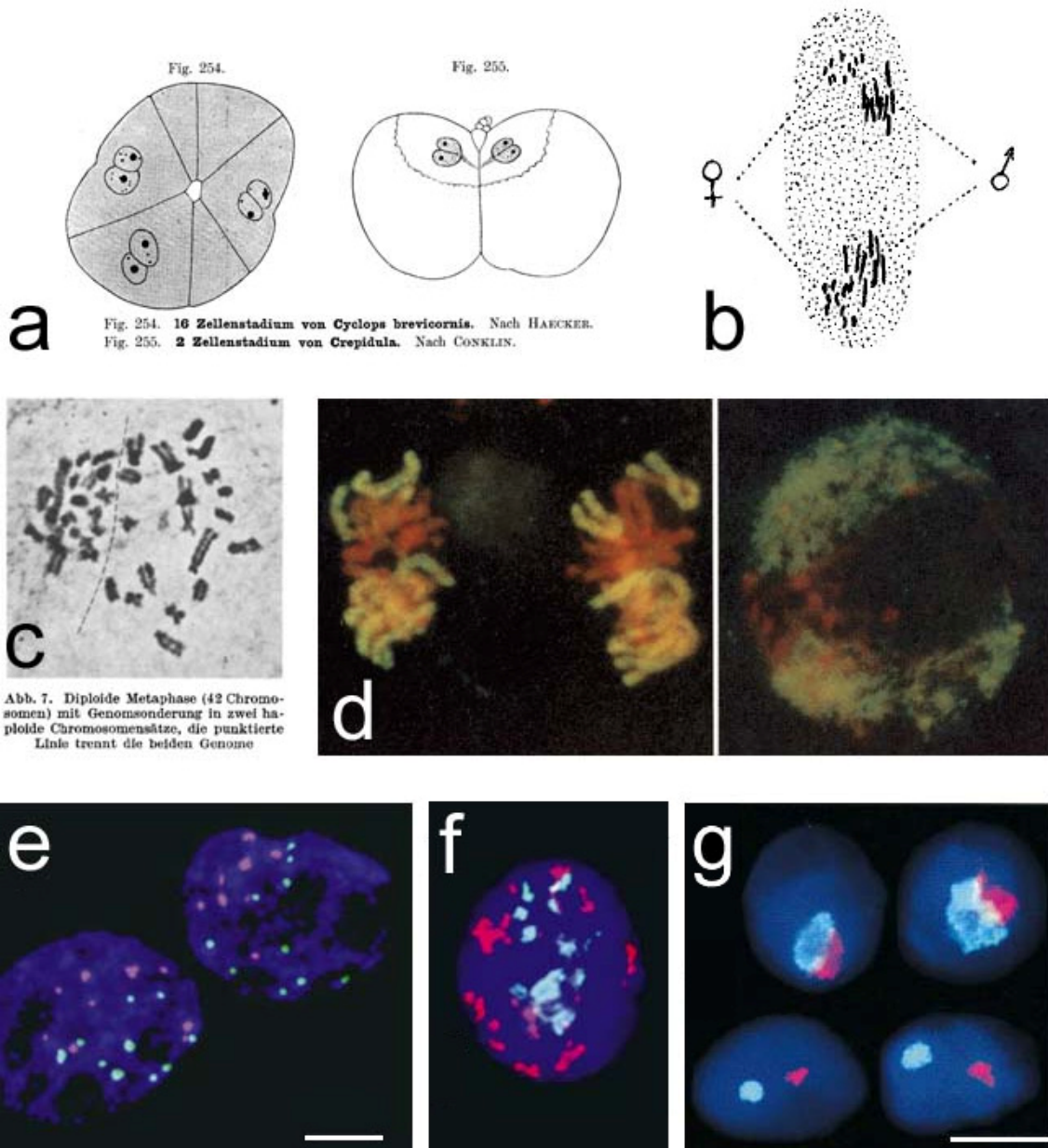


Abb. 2: Bilder aus historischen und neueren Publikationen über Genomseparation in chronologischer Reihenfolge: a) Zweilappige Nuklei einiger Spezies ließ eine Trennung der elterlichen Genome vermuten. Abbildungen aus Hertwig (1906). b) Moenkhaus (1904) untersuchte Fischhybriden bei denen ein Elternteil große und der andere kleine Chromosomen besaß. Aufgrund der Größenunterschiede konnte er in Mitosespreitungen auf die parentale Herkunft einzelner Chromosomen schließen. c) Gläss (1956) untersuchte Metaphasespreitungen aus Rattenleber. Er hatte den Eindruck, dass sich zwei haploide Genome mit einer durchgehenden Linie trennen lassen und schloss daraus auf eine Trennung auch in Interphasekernen. d) Genomseparation existiert in vielen Pflanzenhybriden. Im gezeigten Beispiel eines Roggenhybriden wurde ein elterliches Genom durch FISH mit gesamtgenomischer DNA grün markiert. Um auch die Chromsomen des anderen Elternteils sichtbar zu machen, wurde mit Propidiumiodid gegengefärbt (rot, teilweise sehr schwach). Das linke Bild zeigt eine Anaphase, das rechte einen Interphasekern. Beide Abbildungen aus Leitch et al. (1991). e-f) In Zellkernen von Maushybriden wurden die Zentromere der beiden elterlichen Genome mittels FISH in unterschiedlichen Farben (rot und grün) dargestellt. Beide Abbildungen aus Mayer et al. (2000a), Maßstab: 10 µm. e) Embryo im Zwei-Zell-Stadium. Maternale und paternale Chromosomen liegen größtenteils getrennt vor. f) 5-10% der Fibroblastenkerne zeigen laut den Autoren ein nicht-zufälliges Verteilungsmuster. g) Komplette Segregation der elterlichen Zentromere in männlichen haploiden Keimzellen nach der Spermiogenese. Abbildung aus (Mayer 2000b).

1.2 Markierung von DNA im Zellkern

Bereits Ende des 19. Jahrhunderts untersuchte Theodor Boveri (1888) erstmals die Anordnung von Chromosomen in Säugerzellkernen, lange bevor klar war, dass diese die Träger der Erbinformation sind. Die Entwicklung der Epifluoreszenzmikroskopie und der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie führte zu ganz neuen Möglichkeiten bei der Erforschung der Zellkernarchitektur. In Verbindung mit der **Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung** (FISH) (van der Ploeg 2000; Levsky 2003; Cremer 2006a) und Verwendung verschiedener Fluorochrome, können nicht nur ganze Chromosomen (Übersicht s. Cremer 2006b), sondern auch Chromosomenarme und -abschnitte (Dietzel 1998) oder gar einzelne Genregionen identifiziert werden.

Eine wichtige Methode zur Erforschung der Zellkernarchitektur entstand durch die Entwicklung des **lac-Operator/lac-Repressor-GFP Systems** in der Arbeitsgruppe von A. Belmont (USA) (Robinett 1996; Belmont 1998; Belmont 2001). Mit Hilfe dieses Markierungssystems können subchromosomale DNA-Abschnitte gezielt in fixierten und lebenden Zellen sichtbar gemacht werden. Dazu wird eine lac-Operator Wiederholungseinheit in das gewünschte Genom integriert und durch Bindung eines, von der Zelle stabil exprimierten, GFP-lac-Repressor-NLS Fusionsproteins nachgewiesen. Diese Art der Detektion mittels GFP-Reporter ist äußerst sensitiv (Übersicht s. Chiocchetti 1997). Das ursprünglich aus der Qualle *Aequorea victoria* isolierte, 238 Aminosäuren lange GFP-Protein ist sehr stabil. Es autofluoresziert aufgrund einer autokatalytischen, oxidativen Reaktion (Chalfie 1995; Prasher 1995) auch nach längerer Lichtbelastung unter dem Fluoreszenzmikroskop und beeinträchtigt die Zellen nicht in ihren essentiellen Funktionen. Inzwischen existieren verschiedene Mutationsformen, wie das in dieser Arbeit verwendete EGFP oder YFP. Ein großer Vorteil des lac-Operator/lac Repressor-GFP Systems ist die Tatsache, dass die Zellen nicht wie bei einer Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung aufwändig fixiert und permeabilisiert werden müssen, wodurch es u.U. zu Veränderungen in der 3D-Struktur eines Zellkerns kommen könnte (siehe 3.2 und (Hepperger 2007)). Die Herstellung entsprechender fluoreszenzmarkierter Sonden entfällt ebenfalls. In Kombination mit Lebendzellmikroskopie (Tsukamoto 2000) kann auf diese Weise die Dynamik bestimmter Chromosomenabschnitte über längere Zeiträume und Vorgänge wie Mitosen und Zelldifferenzierungen betrachtet werden.

1.3 Methoden der Zellkernfixierung

Die Bedeutung der Organisation von DNA in Interphasekernen kommt in zahlreichen Studien über Zellkernarchitektur zum Ausdruck (Übersicht s.: Cremer 2004; Fraser 2007; Lanctôt 2007a; Misteli 2007) (siehe auch 1.1). Die einzige Möglichkeit gezielt endogene DNA-Sequenzen in fixierten Zellen zu markieren, ist die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH). Dafür muss die Ziel-DNA für die entsprechenden Sonden zugänglich gemacht und denaturiert werden und gleichzeitig ein bestmöglicher Erhalt der Kernmorphologie gewährleistet sein. Dies steht im Widerspruch zueinander und jede Fixierungsmethode stellt in gewisser Weise einen Kompromiss dieser beiden Ziele dar. Veröffentlichte Studien mit angewandter FISH benutzten meist eine der beiden folgenden Methoden: Fixierung mit gepuffertem Paraformaldehyd (PFA) und anschließender Permeabilisierung oder hypotone Behandlung mit Methanoleisessig-Fixierung (75%:25%), Auftropfen und Lufttrocknen der Präparate (Hypo-MAA = Methanol Acetic Acid). Diese beiden Methoden sind auch als 3D- bzw. 2D-FISH bekannt (Croft 1999).

Zahlreiche FISH-Studien verwendeten bereits in der Vergangenheit paraformaldehydfixierte Zellen zur Untersuchung der Organisation von Chromatin im Zellkern (Cremer 1993; Kurz 1996; Verschure 1999). Bei dieser Methode muss ein Austrocknen der Präparate und damit der Kerne unbedingt vermieden werden. Ziel ist es, die dreidimensionale Ausdehnung der Kerne

lebender Zellen zu konservieren. Obwohl Denaturierung die DNA v.a. auf elektronenmikroskopischem Level schädigt, so scheint die Struktur unter dem konfokalen Lichtmikroskop mit begrenzter Auflösung erhalten zu bleiben (Solovei 2002).

Hypo-MAA Fixierungsprotokolle wurden ursprünglich für die Herstellung von Metaphasespreitungen entwickelt. Der hypotone Schock der Zellen, in Kombination mit Tropfen auf Objektträger und anschließendem Lufttrocknen führt zu gut gespreiteten Metaphasechromosomen, die fest an der Glasoberfläche haften. Die Interphasekerne auf solchen Präparaten sind vergrößert und abgeflacht (Kozubek 2000). Die Fixierung mit Methanoleisessig wird in vielen Studien über Kernorganisation verwendet (Nikiforova 2000; Roix 2003; Chambeyron 2004). Es gibt mehrere Vorteile dieser Präparationsmethode: Zum einen ist es vergleichsweise einfach, helle FISH-Signale auf Hypo-MAA-fixierten Nuklei zu erzeugen. Des Weiteren können mikroskopische Aufnahmen von flachen Strukturen schnell erzeugt und ausgewertet werden. Letztendlich sind auch die Kosten für die benötigte mikroskopische Ausrüstung entsprechend geringer. Für Einzelbilder ist ein normales Epifluoreszenzmikroskop ausreichend, im Gegensatz zur Erstellung dreidimensionaler Aufnahmen mittels Laser-Scanning-Mikroskop (LSM).

1.4 Ziele dieser Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurden mehrere Modelle der Anordnung von DNA im Zellkern untersucht. Zu diesem Zweck wurde zunächst versucht, ein DNA-Markierungssystem mittels lac-Operator/lac-Repressor stabil in embryonale Stammzellen der Maus zu integrieren. Parallel dazu wurde die Anordnung von Genen und Chromosomen in Mausekernen dreidimensional fixierter Zellen untersucht und die Hypothese der Genomseparation in adulten Zellkernen anhand hybrider Maultierzellen überprüft. Dafür wurden zwei gängige Fixierungsmethoden bezüglich des Strukturerhalts miteinander verglichen.

Transfektion embryonaler Stammzellen der Maus mit dem lac-Operator/lac-Repressor-GFP System

Das lac-Operator/lac-Repressor System wurde in unserer Arbeitsgruppe bereits in murinen Erythroleukämie (MEL) Zellen erfolgreich etabliert (Dietzel 2004). Diese Zellen wurden stabil mit zwei Plasmiden transfiziert, dem lac-Operator pPALZ8.8 und dem Repressor p3'SS-EGFP (Plasmide siehe 2.2.1). Die lac-Operator Sequenz ist dabei an einen β -Globin Promotor mit zugehöriger LCR gekoppelt (Robertson 1996), welcher mittels lac-Repressor-GFP markiert wird. Zellen dieser transgenen MEL-Linie können chemisch induziert werden, wodurch es zu einer Aktivierung des β -Globin Transgens durch das zelleigene System kommt, die über das gekoppelte *lacZ*-Gen nachgewiesen werden kann. Die Aktivierung führt dabei zu einer maßgeblichen Veränderung der Ausdehnung und Position des Transgens im Zellkern.

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war die Transfektion embryonaler Stammzellen der Maus mit dem lac-Operator/lac-Repressor System (siehe 3.1). Vergleiche der Position und Größe der Fluoreszenzsignale würden Rückschlüsse auf die Chromatinorganisation und grundlegende Zellkernarchitektur in diesen und zahlreichen daraus differenzierbaren Zellen ermöglichen. Wird die lac-Operator Sequenz an ein Gen oder Transgen wie beispielsweise β -Globin oder Lysozym mit entsprechender LCR gekoppelt, so könnte dieses mittels Differenzierung zu erythroiden Zellen oder Makrophagen aktiviert und ebenfalls mikroskopisch nachgewiesen werden. Somit hätte man die Möglichkeit Gene einzelner Zellen ohne künstliches Aktivierungssystem in aktiver und inaktiver Form zu beobachten und zu vergleichen. In einem Vorversuch (Hepperger 2002) wurde das lac-Operator/lac-Repressor System in eine, im Vergleich zu ES-Zellen, einfach zu handhabende, differenzierbare Zelllinie integriert (siehe 3.1; Abb. 29). Es handelte sich dabei um Maus-Myoblasten der Linie PMI28 (siehe 2.1.2).

Leider gelang in embryonalen Stammzellen keine stabile Integration des Systems. Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt stattdessen auf Untersuchungen der dreidimensionalen Organisation des Säuger-genoms mittels 3D-FISH.

Vergleich zweier Methoden der Zellkernfixierung für FISH

Im Folgenden wird mehreren Fragestellungen der Zellkernarchitektur mit Hilfe der Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung nachgegangen. Um die daraus resultierenden Daten richtig interpretieren zu können, ist der bestmögliche Strukturerhalt des Zellkerns unverzichtbar. Deshalb sollten in der vorliegenden Arbeit die beiden gängigsten Fixierungsverfahren untersucht und miteinander verglichen werden (siehe 3.2). Es handelt sich dabei um die Fixierung mit Paraformaldehyd (siehe 2.3.6) und um die Methanoleisessig-Fixierung mit vorangehender hypotoner Behandlung und anschließendem Trocknen der Präparate (siehe 2.3.5). Es existieren Studien, die parallel PFA- und Hypo-MAA-fixierte Zellkerne für die Untersuchung der Anordnung von subchromosomalen Domänen und Genloci verwendeten und Hinweise für Unterschiede fanden (Volpi 2000; Mahy 2002a; Mahy 2002b; Williams 2002; Chambeyron 2004). Jedoch wurden diese Unterschiede bisher nicht quantifiziert oder entsprechende Strukturunterschiede näher untersucht. Deshalb wurden in diesem Teil der vorliegenden Arbeit PFA- und Hypo-MAA-fixierte Zellen direkt miteinander und innerhalb unserer Arbeitsgruppe zusätzlich mit lebenden Zellen verglichen (Hepperger 2007). Dabei wurde die Morphologie von Zellkernen und Chromatin sowohl qualitativ als auch quantitativ untersucht. Für die Studie wurden Mauszellen verwendet, da aus der Struktur der zentromerischen Heterochromatincluster (Chromozentren) auf den Erhalt des Chromatins in Interphasenuklei geschlossen werden kann. Für die Hybridisierung auf fixierten ES-Zellen wurde ein Chromosomenpaint und ein damit assoziierter Genlocus in Form eines BAC-Klons ausgewählt. Untersucht wurde die Kernform (siehe 3.2.1), der Erhalt der Chromozentren (siehe 3.2.2), die Kompaktheit der jeweiligen Signale, der Abstand des BAC-Signals zur Oberfläche des Chromosomenterritoriums und der Abstand von BAC und Territorium zur Kernoberfläche (siehe 3.2.3).

Anordnung von Genen in Mauszellkernen

In der vorliegenden Arbeit sollte die räumliche Verteilung einzelner Genloci und der zugehörigen Chromosomen (siehe 2.3.1) in logarithmisch wachsenden ES-Zellen und daraus differenzierten, postmitotischen Makrophagen untersucht werden (siehe 3.3), um daraus Schlüsse bezüglich der allgemeinen Genomorganisation in Säugerzellen ziehen zu können. Vereinzelte ES-Zellen besitzen kugelförmige, Makrophagen runde bis deutlich ovale Zellkerne mit einer Höhe, die ihrem halben Durchmesser in xy-Richtung entspricht (Mayer 2005). Im Gegensatz zu den meisten Genen, besitzen die in dieser Arbeit verwendeten Loci keine Korrelation zwischen Gendichte und GC-Gehalt, sowie anderen repetitiven Elementen (siehe Tabelle 8 und Tabelle 9). Stattdessen wurden GC-arme aber genreiche und GC-reiche aber genarme Regionen ausgewählt. Auf diese Weise konnte Positionierung aufgrund von Gendichte und GC-Gehalt unterschieden und die Anordnung von Genloci in Verbindung mit bestimmten Sequenzeigenschaften (CpG-Inseln, LINEs, SINEs und LTR-Elemente) untersucht werden. Die Verwendung einzelner Loci in Form von BACs und nicht BAC-Pools verhinderte ein Abschwächen der Positionierungseffekte aufgrund gegensätzlicher Eigenschaften der Loci.

Anordnung der parental Genome in hybriden Zellkernen des Maultiers

Bezüglich der grundlegenden Organisation von Chromatin im Zellkern ist es wichtig zu wissen, ob elterliche Genome in adulten Zellen tatsächlich getrennt vorliegen oder nicht. Bis heute war diese Frage nicht eindeutig geklärt. Das liegt an der geringen Zahl an Studien über Genomseparation in Säugerzellen, da normalerweise eine Unterscheidung väterlicher und mütterlicher

Chromosomen innerhalb einer Art nicht möglich ist. Es bestand die Vermutung, dass hybride Organismen wie das Maultier eine vielversprechende Ausnahme darstellen. Dabei handelt es sich um das Ergebnis der Kreuzung einer Pferdestute mit einem Eselhengst. In der vorliegenden Arbeit sollte mittels FISH erstmals die Verteilung maternaler und paternaler Chromsomen in dreidimensional konservierten Zellkernen untersucht werden. Der strukturelle Erhalt der Nuklei ist nötig, um Schlüsse auf die in vivo Anordnung ziehen zu können (Hepperger 2007) und um einen Verlust der Genomseparation durch präparative Schritte auszuschließen. Es wurden unterschiedlich markierte, gesamtgenomische Sonden der beiden Elterntiere zunächst auf Metaphasespreitungen und schließlich auf Mitosen und Interphasekerne von Maultierfibroblasten und -lymphozyten hybridisiert. Diese beiden Zelltypen besitzen sehr unterschiedliche Zell- und Kernformen. Lymphozyten sind kugelförmig, Fibroblasten flach und oval. Pferd (*Equus caballus*) und Esel (*Equus asinus*) entwickeln sich seit ca. zwei Millionen Jahren getrennt voneinander (Yang 2004). Es bestand daher die Hoffnung, dass sich besonders die repetitiven Elemente wie Zentromersequenzen ausreichend unterscheiden, um sie in den hybriden Zellen des Maultiers getrennt voneinander nachweisen zu können. Mittels dreidimensionaler Mikroskopie und anschließender visueller und computergestützter Bildanalyse, sollten die folgenden Hypothesen bezüglich der Anordnung elterlicher Genome untersucht werden:

- Befinden sich die elterlichen Genome in getrennten Bereichen des Zellkerns, z.B. eines der beiden in der „linken Hälfte“ und das andere in der „rechten“ (Abb. 3, links)?
- Zeigen parentale Genome unterschiedliche radiale Verteilung, ist z.B. eines eher peripher und das andere mehr intern (Abb. 3, Mitte)?
- Sind die elterlichen Genome in zufällig geformten, aber getrennten Bereichen angeordnet (Abb. 3, rechts)?
- Lagern sich die Zentromere mütterlicher und väterlicher Chromosomen zusammen oder bilden sie separate Cluster?
- Gibt es einen Unterschied bezüglich der relativen Anordnung der Genome zwischen kugelförmigen und flachen Zellkernen?
- Gibt es einen Unterschied bezüglich der Anordnung der Genome zwischen nicht im Zellzyklus befindlichen Lymphozyten und zyklierenden Fibroblasten?

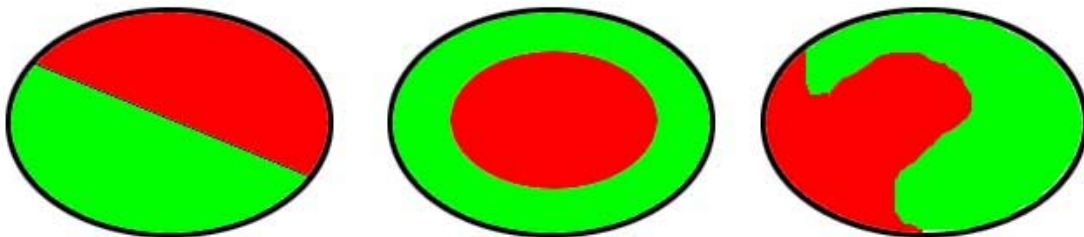


Abb. 3: Verschiedene Möglichkeiten der Trennung parentaler Genome in Interphasekernen. Links: Die beiden Genome sind mittels einer Linie oder Ebene (in 3D) trennbar. Mitte: Ein elterlicher Chromosomensatz befindet sich im Zentrum, der andere in der Peripherie des Zellkerns. Rechts: Die beiden Genome nehmen zufällig geformte Bereiche im Kern ein.

2 Material und Methoden

2.1 Zellkultur

2.1.1 Verwendete Zellen

Folgende Zelltypen wurden in dieser Arbeit verwendet:

- **Maus-Embryonale-Stammzellen (mES)** wurden von C. Bonifer (University of Leeds, UK) zur Verfügung gestellt. Es handelt sich dabei um die beiden männlichen Zelllinien TFL1 und CCE (Robertson 1987). Erstere wurde lediglich für Transfektionsversuche verwendet, die Linie CCE neben Transfektionen für alle Experimente an fixierten Zellen.
- **Maus-Embryonale-Feederzellen (MEF)** wurden in Zusammenarbeit mit Christian Lanctôt (LMU München) aus Fibroblasten 13,5 Tage alter Mausembryonen gewonnen und anschließend mit Mitomycin C gehemmt.
- **Maus-Makrophagen** wurden nach einem Protokoll von T. Schröder (GSF, Institut für klinische Molekularbiologie und Tumorgenetik, München) direkt aus murinen ES-Zellen differenziert. Hierfür benötigt man die Stromazell-Linie OP9 als Feederlayer (Schroeder 2003), sowie L-Zellen und X63 AG-653 Zellen (Faust 1994), welche die Zytokine M-CSF und IL3 sekretieren.
- **Maus-Myoblasten** der Linie **PMI28** wurden von A. Starzinski-Powitz (Kaufmann 1999) zur Verfügung gestellt. Sie wurden ursprünglich aus 4-13 Tage alten Tieren gewonnen (Irintchev 1997).
- **Esel-Lymphozyten** wurden aus dem Vollblut eines Eselhengstes der Rasse Martina-Franca (Tierpark Hellabrunn, München) und eines Hausesels (Dr. Pachten, Klinik für Pferde, LMU, München) isoliert.
- **Pferd-Lymphozyten** wurden aus dem Vollblut zweier Stuten gewonnen (Dr. Pachten, Klinik für Pferde, LMU, München).
- **Maultier-Lymphozyten** entstammen dem Vollblut einer Maultierstute. Dieses wurde von Dr. von Rennenkampff (Tragtierkompanie der Bundeswehr, Bad Reichenhall) zur Verfügung gestellt.
- **Maultier-Fibroblasten** wurden von D. Vanderwall (Department of Animal and Veterinary Science, Idaho, USA) zur Verfügung gestellt. Es handelt sich dabei um eine primäre Linie aus 45 Tage alten, männlichen Maultierföten (Woods 2003).

Auf Besonderheiten der Kultivierung, die Zusammensetzung der Medien, sowie die Fixierung der Zellen wird in den folgenden Abschnitten eingegangen. Ebenso wird die Differenzierung von Makrophagen aus Maus ES-Zellen und die Gewinnung von Lymphozyten aus Vollblut dargestellt.

Die gesamte Zellkultur muß an einer sterilen Werkbank durchgeführt werden. Alle Zellen wachsen bei 37°C in Inkubatoren mit fünfprozentiger CO₂-Sättigung und 100% Luftfeuchtigkeit.

Auftauen und Einfrieren von Zellen

Alle verwendeten Zellen werden in Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff gelagert. Sie befinden sich in ca. 1 ml Kompletmedium oder Serum (ES-Zellen), versetzt mit 10% DMSO (Dimethylsulfoxid, Sigma-Aldrich, Taufkirchen). Das Einfrieren geschieht schrittweise. Zunächst werden die Röhrchen einige Stunden bei -80°C aufbewahrt, bevor sie in den Stickstofftank transferiert werden.

Zum Ansetzen einer Kultur müssen die Zellen möglichst rasch im 37°C Wasserbad aufgetaut werden, um eine Schädigung aufgrund des zugesetzten DMSO zu verhindern. Dazu werden sie in etwas vorgewärmtes Vollmedium überführt und 5 min bei 200 g abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet mit Kompletmedium in einer Gewebekulturflasche resuspendiert.

2.1.2 Kultivierung und Differenzierung von primären Maus-Myoblasten (PMI28)

Maus-Myoblasten wurden in dieser Arbeit zum Testen der Transfektionsbedingungen mit dem lac-Operator/lac-Repressor System verwendet, als Vorversuch für die Transfektion von Maus-ES-Zellen (siehe 2.2). Ebenso wurden auf Zellen dieser Linie FISH-Experimente mit entsprechenden Sonden durchgeführt (siehe 2.3.7).

Kompletmedium (Myoblasten)	F10 + 20% FCS
Kultivierung	Wachstum bei 37°C, alle 2-3 Tage 1:8 - 1:12 splitten
Diff.medium (Myotuben)	DMEM + 10% Pferdeserum

Der Zellzyklus von PMI28 beträgt in etwa 17 Stunden. Die Zellen besitzen einige Trisomien, ansonsten aber einen weitgehend normalen Karyotyp. Die ermittelte Selektionskonzentration beträgt für Hygromycin 200 µg/ml und für Geneticin (G418) 800 µg/ml.

Bei der verwendeten Linie PMI28 handelt es sich um primäre Maus-Myoblasten, die von A. Starzinski-Powitz (Kaufmann 1999) zur Verfügung gestellt wurden. Sie wurden ursprünglich unter sterilen Bedingungen aus 4-13 Tage alten Tieren gewonnen (Irintchev 1997). Die Kulturen werden auf ihre Differenzierungsfähigkeit überprüft, indem das Kompletmedium gegen Differenzierungsmedium ausgetauscht wird. Bereits nach vier Tagen fusionieren die Zellen zu mehrkernigen Myotuben (siehe Abb. 29).

2.1.3 Isolierung, Kultivierung und Wachstumshemmung embryonaler Maus-Fibroblasten (Feederzellen)

Um embryonale Stammzellen zu kultivieren, benötigt man sogenannte Feederzellen, auf denen die ES-Zellen wachsen. Dabei handelt es sich um Maus-Embryonale-Fibroblasten (MEF), deren Teilungsfähigkeit chemisch inhibiert wurde. Sie sezernieren Faktoren, welche ein spontanes Differenzieren der Stammzellen verhindern und ihren pluripotenten Charakter bewahren.

Isolierung von MEF

Alle verwendeten MEF wurden von Christian Lanctôt (LMU, München) unter sterilen Bedingungen aus 13,5 Tage alten Mausembryonen gewonnen (Conner 2001).

Je 20×10^6 der frisch isolierten Zellen werden in gelatinisierten 175 cm² Flaschen ausgesät. Dabei handelt es sich um die erste Passage.

Kultivierung von MEF

Für jegliche Kultivierung von MEF bzw. ES-Zellen auf einem Feederlayer benötigt man gelatinisierte Zellkulturflaschen. Dazu autoklaviert man 0,1 g Gelatine in 100 ml ddH₂O. Die somit erhaltene 0,1-prozentige Lösung gibt man für ca. eine Stunde bodendeckend in die entsprechende Flasche oder Petrischale und saugt den Überschuss anschließend ab. Die Flaschen lässt man ohne Deckel unter der sterilen Werkbank trocknen. Fertig gelatinisierte Flaschen können bis zu vier Wochen im Kühlschrank (4°C) aufbewahrt werden.

MEF-Medium (500 ml)	sonstiges
440 ml DMEM (Biochrom AG # FG0435)	steriles 1×PBS
50 ml FCS	Trypsin / EDTA (Biochrom AG L2153)
5 ml 100× nicht-essentielle Aminosäuren	gelatinisierte T75 und T175 (0,1% Gelatine; Sigma-Aldrich, G-1890/9000-70-8)
5 ml 100× Penicillin / Streptomycin	

- Am 2. Tag nach Isolierung der MEF das Medium in der T175 wechseln. Die Flaschen sollten 70-90% konfluent sein. Nur Fibroblasten können auf der gelatinisierten Oberfläche anwachsen.
- Am 3. Tag die Zellen in 8 ml Trypsin für 3-5 Minuten bei 37°C inkubieren und anschließend in 2 ml Kompletmedium durch auf- und abpipettieren resuspendieren. Es handelt sich hierbei um die zweite Passage.
- Anschließend alle Zellen poolen und auszählen (Fuchs-Rosenthal Kammer). In einer 175 cm² Flasche sollten 30×10⁶ bis 40×10⁶ Zellen enthalten sein.

An diesem Punkt sollte die Hälfte der Zellen eingefroren werden. Der verbliebene Anteil wird mit einer Dichte von 10×10⁶ Zellen pro 175 cm² Flasche ausgesät. Nach zwei Tagen wird das Medium gewechselt und die Zellen entweder ebenfalls eingefroren oder für den weiteren Gebrauch sofort mit Mitomycin C gehemmt. Es handelt sich dabei um Zellen der dritten Passage. Öfter als 3-4 mal sollten die Fibroblasten nicht passagiert werden, um ihren primären Zustand zu erhalten.

MEF-Inaktivierung mittels Mitomycin C

Aufgrund der Toxizität von Mitomycin C (Sigma, # M0503) muss bei den folgenden Schritten sehr sorgfältig gearbeitet werden. Alle benutzten Gegenstände wie Handschuhe und Pipetten, sowie jeglicher Flüssigabfall wird getrennt gesammelt und entsorgt.

- 5×10⁶ eingefrorene oder frisch gesplittete MEF in einer gelatinisierten T75 aussäen. Die Anzahl der Zellen verdoppelt sich in 2-3 Tagen.
- Altes Medium durch frisches Kompletmedium mit 10 µg/ml Mitomycin ersetzen.
- Inkubation von 2,5 Stunden bei 37°C.
- Medium abnehmen und gesondert entsorgen.
- 3× mit 10 ml vorgewärmtem PBS waschen, wobei die ersten 10 ml ebenfalls als toxisch anzusehen sind.
- 3 ml Trypsin zugeben und für 2-3 min inkubieren, bis die Zellen sich ablösen.

- Zellen durch Pipettieren in 7 ml Komplettmedium resuspendieren.
- Zellen zählen, danach einfrieren oder aussäen.

Um einen Feederlayer für ES-Zellen vorzubereiten, werden 8×10^4 bis 10×10^4 Zellen/cm² in einer gelatinisierten Flasche oder Petrischale ausgesät. Die Zellen sind 2-7 Tage nach der Mitomycinbehandlung konfluent und in einem für die Zugabe der ES-Zellen optimalen Zustand. Inaktivierte Feederzellen können auch eingefroren werden.

2.1.4 Kultivierung von embryonalen Maus-Stammzellen (ES-Zellen)

Material für ES-Zell-Medium	Konzentration	für 200 ml
DMED VLE (very low endotoxin) FG 1445, Biochrom AG, Berlin		160 ml
FCS (für ES-Zellen getestet) Kat.: 10099-158, Lot.: 30399675; Gibco BRL, Scotland		30 ml
L-Glutamin Biochrom AG, Berlin	200 mM	2 ml
LIF (konditioniertes Medium) Zellkulturüberstand von CHO 8/24720 LIF-D Zellen		0,2 ml
Monothioglycerol (MTG) Merck, Darmstadt	0,15 M	0,2 ml
MEM: nicht-essentielle Aminosäuren Gibco / Invitrogen, Karlsruhe	100×	2 ml
Natriumpyruvat Gibco / Invitrogen, Karlsruhe	100 mM	2 ml
Penicillin / Streptomycin / Amphotericin (B) Gibco / Invitrogen, Karlsruhe	100×	2 ml
zweifach konz. Trypsin-EDTA (0,25% Trypsin, 1 mM EDTA; Kat.: 25200-056, Invitrogen)		

ES-Zellen der Linie CCE und TFL1 werden auf einem Feederlayer aus Mitomycin-gehemmten Fibroblasten in gelatinisierten Flaschen kultiviert. Zusätzlich wird das Medium mit 0,7% LIF (leukemia inhibitory factor) angereichert, um die Zellen in ihrem ursprünglichen, undifferenzierten Zustand zu bewahren. LIF wird aus dem konditionierten Medium der Zelllinie CHO 8/24 720LIF-D(1) gewonnen (Faust 1997). HEPES-Puffer stabilisiert den pH-Wert von 7 des Komplettmediums.

2×10^4 ES-Zellen/cm² werden auf einen konfluenten Feederlayer ausgesät und nach 2-3 Tagen bei einer 50- bis 75-prozentigen Konfluenz der Kolonien 1:8 bis 1:4 gesplittet. Dazu werden Feeder- und ES-Zellen gemeinsam abtrypsinisiert und auf einen neuen Feederlayer gegeben.

ES-Zellen sollten so wenig wie möglich passagiert werden. Alle Experimente werden möglichst zügig durchgeführt und überschüssige Zellen wieder eingefroren. Das Medium sollte häufig gewechselt werden, evtl. täglich, wenn eine hohe Dichte erreicht ist, spätestens jedoch, wenn sich das Medium verfärbt. Die Kolonien sollten niemals vollständige Konfluenz erreichen.

2.1.5 Nachweis primärer und unausdifferenzierter ES-Zellen

Embryonale Stammzellen müssen immer mit großer Sorgfalt kultiviert werden. Bei unsachgemäßer Handhabung können sie spontan ausdifferenzieren. ES-Zell-Kolonien sollten einen gleichmäßigen und dreidimensionalen Charakter aufweisen (Abb. 4). Bei unregelmäßigen und flachen Kolonien liegt der Verdacht nahe, dass die Zellen bereits ausdifferenzieren und ihre primären Eigenschaften verlieren. Neben der optischen Kontrolle wurden Oct3/4-Antikörperfärbung und Färbung der Alkalinen Phosphatase (ALP) als Nachweisverfahren für undifferenzierte Stammzellen angewandt.

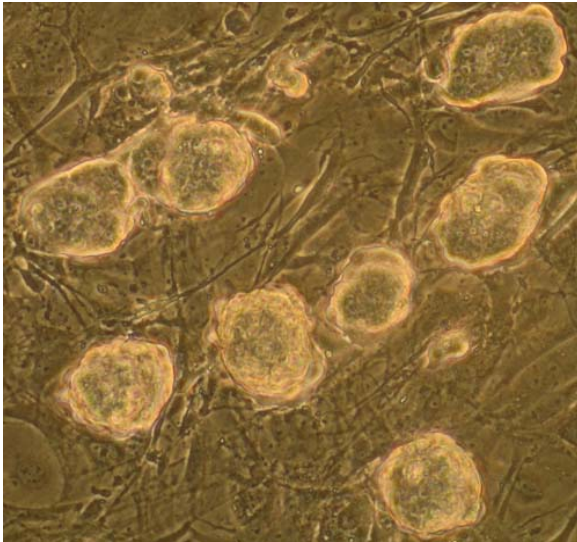


Abb. 4:
Embryonale Stammzellen (ES-Zellen) der Maus werden auf einer Schicht konfluenter, embryonaler Mausfibroblasten (MEF), sogenannten Feederzellen, kultiviert. Die undifferenzierten ES-Kolonien sollten nicht zu dicht liegen und dreidimensionalen Charakter besitzen. Die Ränder der Kolonien sind dabei mehr oder weniger gleichmäßig und die Einzelzellen nicht zu erkennen.

Karyotypisierung der verwendeten ES-Zelllinie

Um sicherzugehen, dass die verwendete ES-Zelllinie CCE einen vollständigen und normalen Karyotyp aufweist, wurde zunächst ein Karyogramm erstellt (Abb. 5). Dazu wurden Metaphasespreitungen hergestellt (siehe 2.3.4) und in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von M. Speicher (LMU, München) eine M-FISH durchgeführt. Mittels Falschfarbenzuordnung können alle 40 Chromosomen getrennt voneinander dargestellt werden. Von 12 untersuchten Metaphasen hatten 9 einen normalen Karyotyp ohne sichtbare Umbauten wie Deletionen, Insertionen oder Translokationen. Eine Metaphase zeigte ein zusätzliches Chromosom 7 und eine weitere ein zusätzliches Chromosom 1 und Chromosom 8. Dabei handelt es sich wahrscheinlich um zufällig angespülte Chromosomen aus einer anderen Zelle, da die Zahl der mitotischen Zellen und damit die Dichte der Metaphasen auf dem Präparat sehr hoch war. Es wird von einem normalen Karyotyp dieser Stammzelllinie ausgegangen.

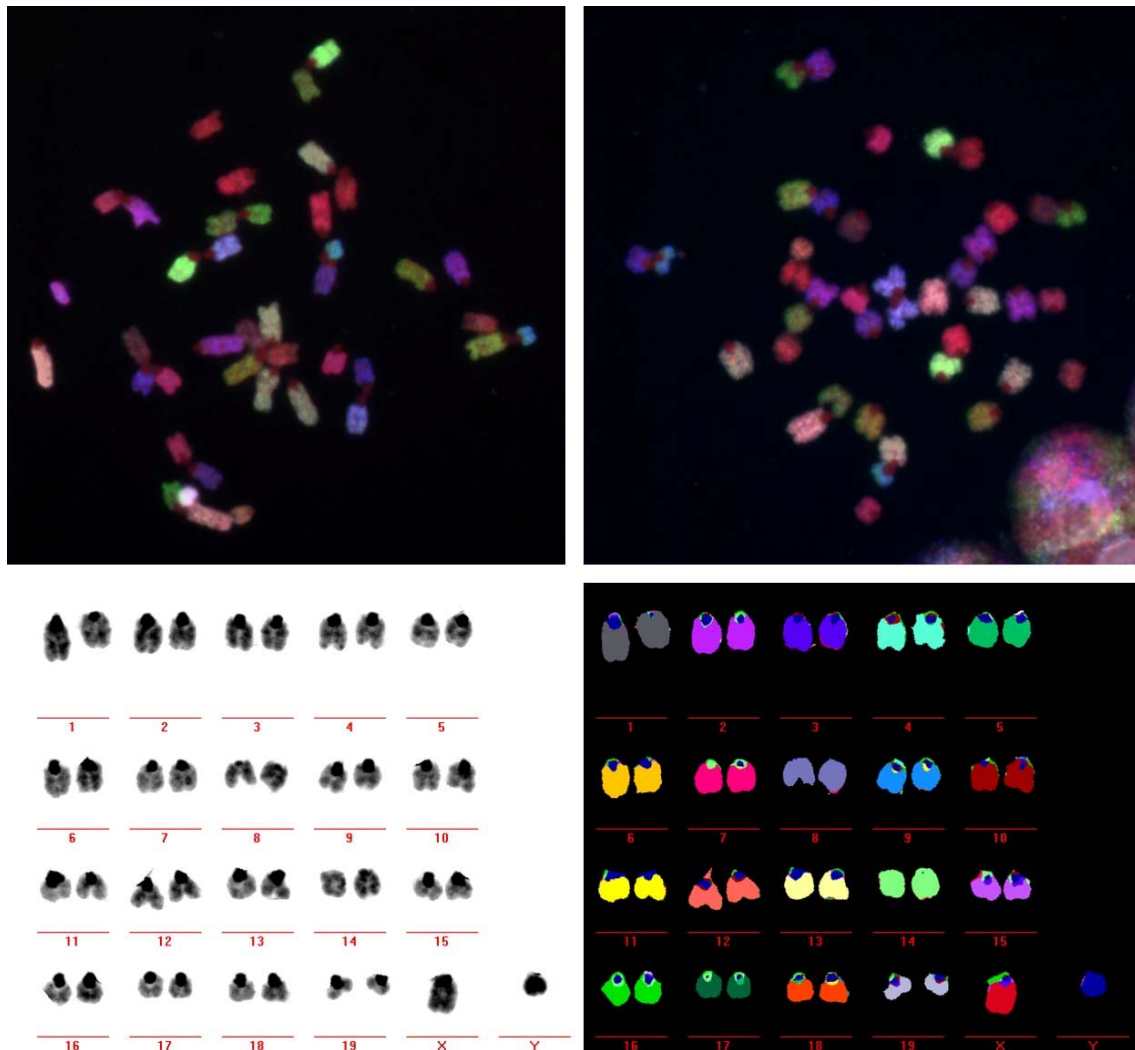


Abb. 5: M-FISH auf zwei kompletten, unterschiedlich stark kondensierten Metaphasespreitungen muriner ES-Zellen der Linie CCE (obere Reihe) mit jeweils 40 Chromosomen. Mittels Falschfarbenzuordnung wurden die Chromosomen zu einem vollständigen Karyogramm angeordnet (untere Reihe). Die Karyotypisierung wurde in Zusammenarbeit mit Sandro Brero (LMU München) und Isabell Jentsch aus der Arbeitsgruppe von M. Speicher (TU München) durchgeführt.

Immunfluoreszenzfärbung mit Oct3/4-Antikörper

Material für Oct3/4-Immunofärbung	Hersteller
Triton X-100	Merck, Darmstadt
Blocklösung (4% BSA / 1×PBT)	Sigma-Aldrich, BSA, Kat.:A8806
Maus-α-Oct3/4 Antikörper (Verd. 1:50)	Biosciences, Pharmingen, Kat.:611202
Schaf-α-Maus-Cy3 (Verd. 1:500)	Dianova, Hamburg
DAPI (5 µg/ml)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Der Transkriptionsfaktor Oct3/4 wird spezifisch in ES-Zellen exprimiert. Durch einen Antikörper gegen Oct3/4 kann dieser sichtbar gemacht werden (Abb. 6) und so der Kontrolle dienen, ob sich die Zellen noch in einem undifferenzierten Stadium befinden (Nishimoto 1999).

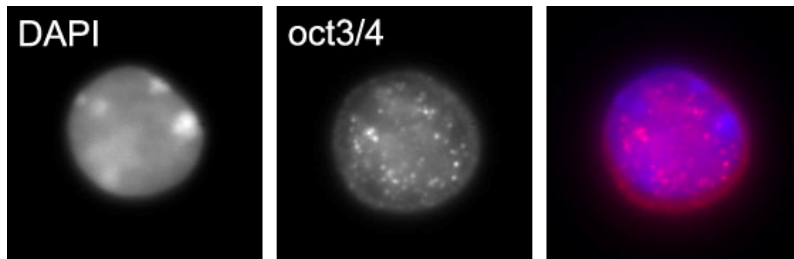


Abb. 6:
Antikörpernachweis des spezifischen Transkriptionsfaktors Oct3/4 in einer undifferenzierten ES-Zelle. Siehe Abb. 34 für den Oct3/4-Nachweis in einer ES-Kolonie.

- ES-Zellen (evtl. zusammen mit Feederzellen als Negativkontrolle) mit 4% PFA fixieren
- fixierte Zellen mit Triton X-100 (0,5% in PBS) 10 min permeabilisieren
- Deckgläser mit den Zellen 15 min in Blocklösung bei 37°C legen
- Maus-Oct3/4-Antikörper 1:50 in Blocklösung verdünnen, auf die Zellen geben und mit Parafilm abdecken; 45 min Inkubation bei 37°C in einer feuchten Kammer
- 3×3 min waschen in 1×PBS-Tween
- 45 min Inkubation mit dem sekundären Antikörper Schaf- α -Maus-Cy3 (lichtgeschützt)
- 3×3 min waschen in 1×PBS-Tween
- 2 min Gegenfärbung des Zellkerns mit DAPI (1:100 in PBS-Tween)
- Kurz mit PBS-Tween abspülen
- In Vectashield einbetten und mit Nagellack versiegeln

ALP (Alkaline Phosphatase) - Färbung

Material für ALP-Färbung:	Konzentration
Tris	0,5 M; pH 9
MgCl ₂	1 M
NaCl	5 M
PFA	4% in 1×PBS; pH 7,4
NBT/BCIP	-
1×PBS	-
Equilibrierlösung (frisch angesetzt):	
Tris pH 9,5 50 mM (2 ml von 0,5 M) + MgCl ₂ 50 mM (1 ml von 1 M) + NaCl 100 mM (0,4 ml von 5 M) add 20 ml H ₂ O	
Färbelösung (frisch angesetzt):	
Equilibrierlösung mit zusätzlich 4,5 μ l/ml NBT und 3,5 μ l/ml BCIP	

ALP gilt als Marker von Keimzellen und pluripotenten Zellen und somit auch embryonalen Stammzellen (Abb. 7).

Die zu untersuchenden Zellen sollten mit mittlerer Dichte ausgesät und gefärbt werden, bevor die Kolonien allzu groß sind. Z.B. lässt man auf einem 24×50 Deckglas 10^6 Zellen zwei Tage lang wachsen.

- Zellen einmal mit PBS spülen
- bei RT 15 min mit 4% PFA fixieren
- 2×5 min mit PBS waschen (nach diesem Schritt können die Zellen 1-3 Tage bei 4°C gelagert werden)
- Deckgläser 10 min bei RT in Equilibrierlösung inkubieren
- Deckgläser 20 min lichtgeschützt in Färbelösung legen (wegen möglicher Überfärbung nach 10 min prüfen)
- Reaktion durch dreimaliges Waschen in kaltem PBS stoppen
- Deckgläser müssen nicht eingedeckelt werden, sondern können in PBS mittels Phasenkontrast betrachtet werden.

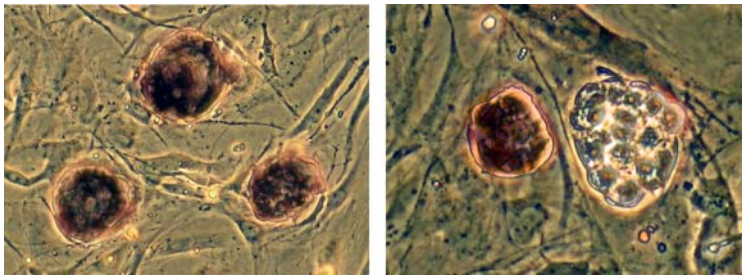


Abb. 7:

Links: Drei differenzierungsfähige ES-Kolonien mit positiver ALP-Färbung auf Feederzellen. **Rechts:** Vergleich mit ALP-negativer Kolonie einer ausdifferenzierenden Kultur. Einzelne Zellen der ungefärbten Kolonie sind erkennbar.

Rund 95% der Zellen beider Stammzell-Linien (CCE und TFL1) zeigten eine positive Oct3/4- und ALP-Färbung, was für den Erhalt des stammzelltypischen, primären Charakters undifferenzierter Zellen spricht.

2.1.6 Unspezifische Differenzierung von ES-Zellen

Um ES-Zellen unspezifisch zu differenzieren wurden, parallel zur normalen ES-Kultur, vier verschiedene Ansätze mit unterschiedlichen Kulturbedingungen getestet:

- a) Kultivierung auf MEF mit ES-Medium ohne LIF (Leukemia Inhibitory Factor)
- b) Kultivierung auf gelatinisierter Oberfläche ohne MEF mit ES-Medium ohne LIF
- c) Kultivierung ohne MEF auf ungelatinisierter Oberfläche mit ES-Medium ohne LIF
- d) Kultivierung ohne MEF auf ungelatinisierter Oberfläche mit Feeder-Medium

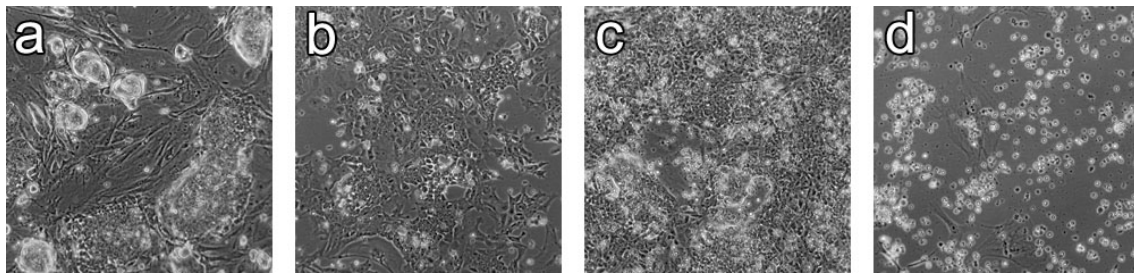


Abb. 8: Unspezifische Differenzierung von ES-Zellen mittels vier verschiedener Vorgehensweisen (a, b, c und d) führt zu Zellen mit sehr unterschiedlicher Morphologie. Ausgangsmaterial waren undifferenzierte ES-Zellen auf Feederzellen (siehe Abb. 4). Die Bilder zeigen die Zellen nach fünf Tagen Differenzierung.

Bereits nach drei Tagen waren die ES-Zellen aus Ansatz d tot. Nur einige wenige Feederzellen, die nicht vollständig abgetrennt wurden, wuchsen weiter. In allen anderen Ansätzen waren die Zellen bereits mehr oder weniger differenziert, wobei die regelmäßige Struktur der Kolonien verloren ging und die Zellen sehr unregelmäßige Formen annahmen.

Nach fünf Tagen (Abb. 8) hatten sich die Zellen in den übrigen Ansätzen a, b und c stark vermehrt. Nur in a waren noch wenige Kolonien zu erkennen, die meist jedoch ungewöhnlich flach und inhomogen schienen. Die restlichen Zellen wuchsen einzeln, waren abgeflacht und sehr unterschiedlich geformt. Ihr Stammzellcharakter ging vollständig verloren.

Zellen aus allen vier Ansätzen wurden anschließend fixiert und ein Oct3/4-Antikörperrnachweis durchgeführt (siehe 2.1.5). Dieser zeigte, dass kaum noch primäre Zellen mit Stammzeleigenschaften vorhanden waren (Abb. 9). Besonders in Ansatz c schien die Differenzierung weit vorangeschritten, da nur noch wenige Zellen eine schwache Fluoreszenz zeigten. Die Zellen hatten sehr unterschiedliche Größen und unregelmäßige Oberflächen.

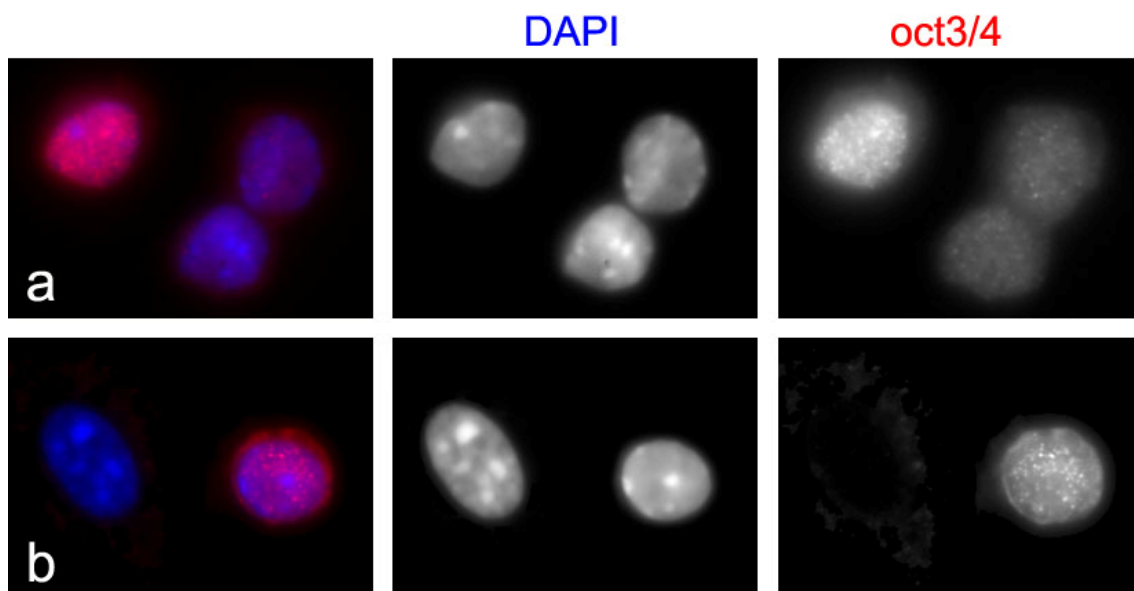


Abb. 9: Oct3/4-Antikörperrnachweis auf differenzierten ES-Zellen aus Ansatz c. a) Zellen nach drei Tagen Differenzierung mit ähnlicher Kernmorphologie und abnehmender Oct3/4-Expression. b) Nach fünf Tagen Differenzierung exprimieren nur noch sehr wenige Zellen Oct3/4 (rechts). Die meisten haben die Expression komplett eingestellt und besitzen eine veränderte Zell- und oft sogar Kernmorphologie (links).

Für weitere Experimente bzw. Hybridisierungen auf differenzierten ES-Zellen wurden deshalb Zellen aus Ansatz c verwendet.

2.1.7 Differenzierung von ES-Zellen zu Makrophagen

Die Makrophagen für diese Arbeit wurden aus Stammzellen der Linie CCE nach einem Protokoll von T. Schroeder (2003) differenziert. Dazu werden ES-Zellen auf spezielle Feederlayerzellen (OP9) gegeben. Die von ihnen sezernierten Wachstumsfaktoren regen die Stammzellen an, sich zu differenzieren.

Verwendet wird die Stroma-Zelllinie OP9, die eine Differenzierung in Richtung mesodermaler Zellen (wie Blut-, Muskel- und Endothelzellen) veranlasst. Die Linie stammt von ausgespülten Stromazellen der Maus, die sich selbstständig immortalisiert haben (Nakano 1994).

Material für OP9-Kultivierung	Hersteller
10% FCS	3302-P200709 von PAN Biotech GmbH, Aidenbach
α -MEM (Pulver)	Kat.:11900-016; Gibco / Invitrogen, Karlsruhe
Aqua injectabilia	Kat.:3703452; Braun, Melsungen
NaHCO_3	Merck, Darmstadt
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Penicillin / Streptomycin	Gibco / Invitrogen, Karlsruhe

Ansetzen von OP9-Medium

- α -MEM Trockenmedium in 950 ml Aqua injectabilia auflösen
- 2,2 g NaHCO_3 zugeben und 15 min rühren lassen, bis das Pulver vollständig gelöst ist
- pH-Wert auf 7 einstellen und auf 1 l auffüllen; steril filtrieren
- 10% FCS (für OP9) und 10^{-4} β -Mercaptoethanol zugeben (1:1000 Verdünnung)

Das Medium kann bis zu drei Wochen bei 4°C aufbewahrt werden.

Kultivieren und Splitten der OP9-Zellen

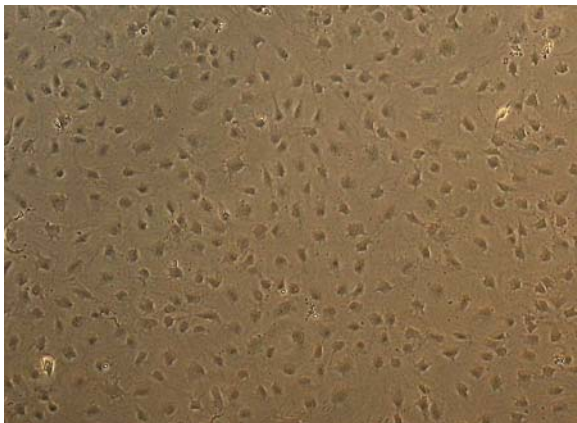


Abb. 10:
OP9-Zellen im Phasenkontrastmikroskop. Für die Differenzierung von Makrophagen aus ES-Zellen wird eine konfluente Kultur dieser Stromazellen benötigt. Die einzelnen Zellen sind stark abgeflacht und kontrastarm.

Man lässt die Zellen konfluent wachsen, so dass keine Pseudopodien der Zellen und kein Gefäßboden mehr sichtbar sind. Die Zellen liegen dann ganz flach auf dem Boden des Gefäßes an

und sind im Mikroskop sehr kontrastarm (Abb. 10). Es sollten wenig Fettzellen (hell, mit Fetttropfchen) sichtbar sein.

Die Zellen werden alle vier Tage 1:3 - 1:5 gesplittet. Ein zu häufiges Umsetzen ist zu vermeiden, da man sonst schnell wachsende Zellen anreichert, die keine guten Stroma-eigenschaften mehr besitzen. Die OP9-Zellen sitzen sehr fest auf dem Gefäßboden. Deshalb werden die Zellen 5 min bei 37°C trypsiniert und vorher gut mit PBS gespült. Die Zellen sollen sich dabei einzeln ablösen und nicht in Klumpen oder gar Teppichen. Die Flasche sollte währenddessen möglichst wenig bewegt werden. Das Trypsin wird schließlich mit Medium inhibiert und die Zellen mittels auf- und absaugen weiter vereinzelt. Erst danach wird das restliche Medium zugegeben und die Zellsuspension in neue Gefäße verteilt. Besonders 6er oder kleinere Wells müssen vorsichtig gehandhabt werden, damit die Zellen nicht in der Mitte zusammengespült werden.

Differenzierung von ES-Zellen zu Makrophagen

ES-Differenzierungsmedium 1	Konzentration	für 100 ml
α-MEM	-	90 ml
FCS (3302-P201412 von PAN Biotech, Aidenbach)	10%	10 ml
β-Mercaptoethanol (Stock: 0,1 M)	10 ⁻⁴	100 µl
ES-Diff.medium 2 = Makrophagen-Medium	Konzentration	für 100 ml
entspricht ES-Diff.medium 1 (s. o.) + zusätzlich:		
MCSF (macrophage colonie stimulating factor), von L-Zellen konditioniertes Medium	15%	15 ml
IL-3 (Interleukin-3), konditioniertes Medium der Zelllinie X63 AG-653	1%	1 ml

Die Differenzierung von ES-Zellen zu Makrophagen beansprucht ca. 14 Tage und erfordert mehrere Teilschritte. OP9-Stromazellen (siehe Abb. 10) werden in einer T25 herangezogen, eine weitere Flasche sollte fünf Tage später konfluent sein. Mindestens eine gelatinisierte T75 sollte vorbereitet sein.

Tag 0: ES-Zellen werden kultiviert, so dass sie sich im exponentiellen Wachstum befinden, die Kolonien aber nicht zu groß sind (siehe Abb. 4).

Tag 1: ES- und Feederzellen werden nun trypsiniert und so gut wie möglich vereinzelt. Dazu gibt man das abtrypsinierte Zellgemisch mit neuem ES-Medium in eine gelatinisierte T75 und stellt es für ca. 30 Minuten zurück in den Brutschrank. In dieser Zeit setzt sich ein Großteil der Feeder, nicht jedoch die ES-Zellen ab. Diese benötigen länger, um auf dem Gefäßboden anzuwachsen. Gegebenenfalls wird dieser Schritt wiederholt. Die somit erhaltenen Stammzellen werden abpipettiert und in Differenzierungsmedium aufgenommen. Besonders wichtig ist, dass die Zellen vereinzelt und nicht in Klumpen vorliegen. Die Zellen werden gezählt. Für eine mit OP9 bewachsene T25 benötigt man lediglich 20.000 Zellen. Sie werden vorsichtig mit Differenzierungsmedium gemischt und auf den OP9-Layer gegeben.

Tag 3: Viele runde Kolonien sind auf den OP9 sichtbar, einige davon flachen sich bereits ab (Abb. 11, Tag 3).

Tag 5: Die ES-Kolonien sind groß, stark abgeflacht und von einem Wulst von OP9 umgeben, die zur Seite geschoben werden (Abb. 11, Tag 5). Die Zellen werden 5 Minuten trypsiniert, mit Differenzierungsmedium gestoppt und intensiv vereinzelt. Die Zellen werden für eine Stunde in

eine Kulturflasche mit dreifacher Bodenfläche (T75) in den Inkubator zurückgestellt. In dieser Zeit setzen sich die alten OP9-Zellen auf dem Boden des Gefäßes ab und die andifferenzierten ES-Zellen können abgespült und auf die neuen OP9-Feeder überführt werden. Kontrolle nach einer halben Stunde ist nötig, um möglichst keine differenzierenden Zellen durch Absetzen zu verlieren.

Tag 6: Die differenzierenden ES-Zellen setzen sich schnell wieder ab und bilden flache Kolonien, die kaum von den OP9-Zellen zu unterscheiden sind.

Tag 7: Es sind bereits wenige kleine, traubige Zellkolonien zu sehen. Sie sind hell und kontrastreich und knospen nach oben ins Medium Blutzellen ab. Man sieht auch Dubletten von diesen Suspensionszellen. Größere, flächige Kolonien bestehen aus Endothelzellen.

Tag 8: Die traubigen Zellkolonien sollten sich vermehrt haben und viele Zellen in Suspension sein (Abb. 11, Tag 8). Dabei handelt es sich um Blutstammzellen. Diese nimmt man nun ab, bevor sie wieder in die OP9-Stromaschicht einwandern. Sie werden 5 min bei 200 g zentrifugiert, in frischem Makrophagenmedium mit entsprechenden Cytokinen (MCSF und IL-3) resuspendiert und in ein neues Gefäß überführt.

Tag 9-13: Die zunächst freischwimmenden Zellen setzen sich bald ab und bilden auf dem Boden des Kulturgefäßes kleine Haufen sich entwickelnder Makrophagen (Abb. 11, Tag 12). Die zunächst runden Zellen flachen dabei immer mehr ab und bekommen ihre typische, dendritische Form. Die fertig ausdifferenzierten Makrophagen werden nun abtrypsiniert, um sie für eine Fixierung auszusäen oder einzufrieren. Sie sind nicht mehr teilungsfähig und haben eine begrenzte Lebensdauer, weshalb sie nicht unnötig lange weiter in Kultur gehalten werden sollten. Das Trypsinieren gestaltet sich oftmals schwierig, da die Zellen sehr gut am Gefäßboden anhaften. Evtl. muss ein steriler Zellschaber verwendet werden.

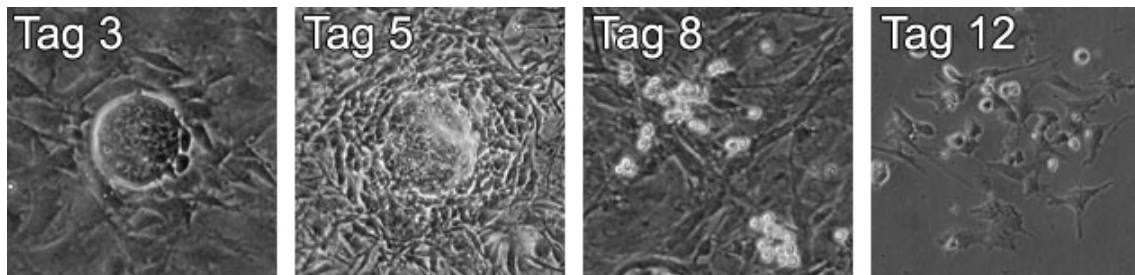


Abb. 11: Die Differenzierung von ES-Zellen zu Makrophagen beansprucht mehrere Tage und Teilschritte.

2.1.8 Nachweis vollständig differenzierter Makrophagen

Für die erfolgreiche Differenzierung von ES-Zellen zu funktionsfähigen Makrophagen gibt es mehrere Nachweismöglichkeiten:

Optische Kontrolle

Wichtig ist zunächst, die Zellen genau zu betrachten. Sie sollten sehr flach und fest angewachsen sein. Mit zunehmendem Alter wird ihr dendritischer Charakter immer ausgeprägter. Das heißt, sie besitzen eine sehr unregelmäßige, gezackte und eingebuchtete Zelloberfläche mit viel Zytoplasma (siehe Abb. 13). Oftmals ist eine langgestreckte Zellform zu beobachten. Vollständig ausdifferenzierte Zellen teilen sich nicht mehr. Dies kann besonders gut auf einem Deckglas

mit eingetragtem Koordinatensystem (grid) über einen Zeitraum von 1-2 Tagen kontrolliert werden. Die Zahl der Zellen nimmt nicht weiter zu.

Nachweis der Teilungsunfähigkeit mit BrdU

Material für BrdU-Nachweis	Konzentration	Hersteller
Bromodesoxyuridin (BrdU)	Stock: 10 mM	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Blocklösung, Bovines Serumalbumin Fraktion V (BSA)	4% BSA in 1×PBS	ICN Biomedicals, Eschwege
Maus- α -BrdU Antikörper	1:200	Becton Dickinson, San Jose
beliebiger sekundärer α -Maus Antikörper	-	-

Zusätzlich zu der Beobachtung der Teilungsunfähigkeit von Makrophagen im Phasenkontrast, erfolgt ein Nachweis mit Hilfe des Thymidinanalogs Bromodesoxyuridin (BrdU). Dieses wird für ca. 15 min mit einer Endkonzentration von 10 μ M in das Medium der Zellen in Kultur gegeben. In der S-Phase sich teilender Zellen wird teilweise BrdU anstatt Thymidin in die neu synthetisierte DNA eingebaut. Nach der Detektion mit einem Fluorochrom-gekoppelten Antikörper haben sich noch teilende, nicht vollständig ausdifferenzierte Zellen einen mehr oder weniger stark fluoreszierenden Kern, während fertig ausdifferenzierte Makrophagen keinerlei Fluoreszenzsignal aufweisen (Abb. 12).

Nachweis des BrdU-Einbaus:

- Fixieren der Zellen in 4% PFA
- 3×5 min waschen in PBS + 0,5% Triton
- 3×5 min waschen in PBST
- 5 min in 0,1 M HCl
- 3×5 min waschen in PBST
- 20 min Inkubation in Blocklösung
- 45 min Inkubation des α -BrdU Antikörpers in einer feuchten Kammer
- 3×5 min waschen in PBS
- 45 min Inkubation des sekundären Antikörpers in einer feuchten Kammer
- 3×5 min waschen in PBS
- Gegenfärben und eindeckeln

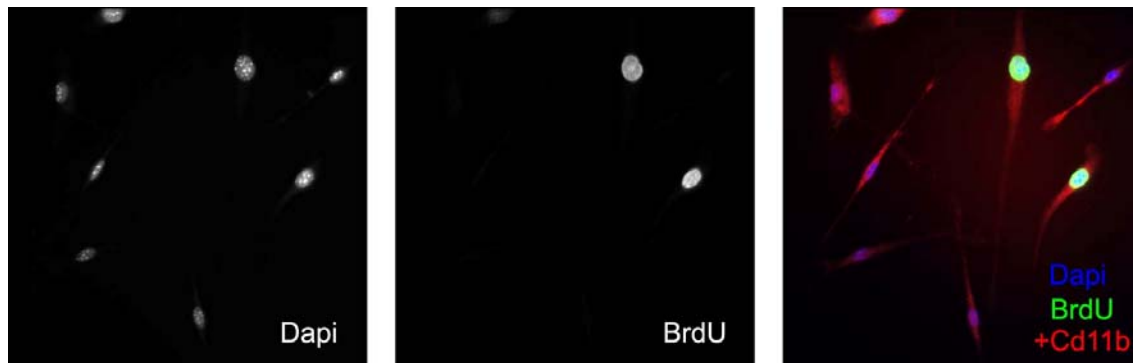


Abb. 12: BrdU-Nachweis bei in vitro differenzierten Makrophagen. Bis Tag 11 nach Beginn der Differenzierung teilen sich noch einige Zellen und bauen deshalb das zugegebene BrdU in ihre DNA ein (Mitte und RGB-Projektion rechts). Zwischen Tag 12 und 13 erreichen sie das postmitotische Stadium und stellen die Teilungen komplett ein. Der BrdU-Nachweis ist dann vollständig negativ. Diese BrdU-negativen Zellen wurden für FISH-Experimente verwendet.

CD11b-Nachweis

Material für CD11b-Immunofärbung	Hersteller
Triton X-100	Merck, Darmstadt
Blocklösung (4% BSA / 1×PBT)	Sigma-Aldrich, BSA, Kat.:A8806
Ratte- α -CD11b Antikörper (Verd. 1:100)	erhalten von C. Bonifer (Leeds, UK)
sek. AK: z.B. Ziege- α -Ratte-Cy3 (1:100)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
DAPI (5 μ g/ml)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Terminal differenzierte Makrophagen werden zusätzlich mittels Immunofärbung identifiziert. CD11b ist ein Oberflächenantigen (Corbi 1988; Kernohan 1990), das von ausdifferenzierten Blutzellen wie Makrophagen exprimiert wird. Es wird mit zwei Antikörpern (Ratte- α -Cd11b und Ziege- α -Ratte-Cy3) direkt nach der Fixierung und vor der Permeabilisierung und FISH-Hybridisierung nachgewiesen (Abb. 13). Der Vorgang gleicht dem in 2.1.5 beschriebenen Oct3/4-Nachweis, nur dass nicht permeabilisiert wird. Auf Deckgläsern mit Koordinatensystem findet man entsprechende Zellen auch nach einer FISH wieder, obwohl die Immunofärbung dann nicht mehr zu sehen ist (siehe 2.3.10).

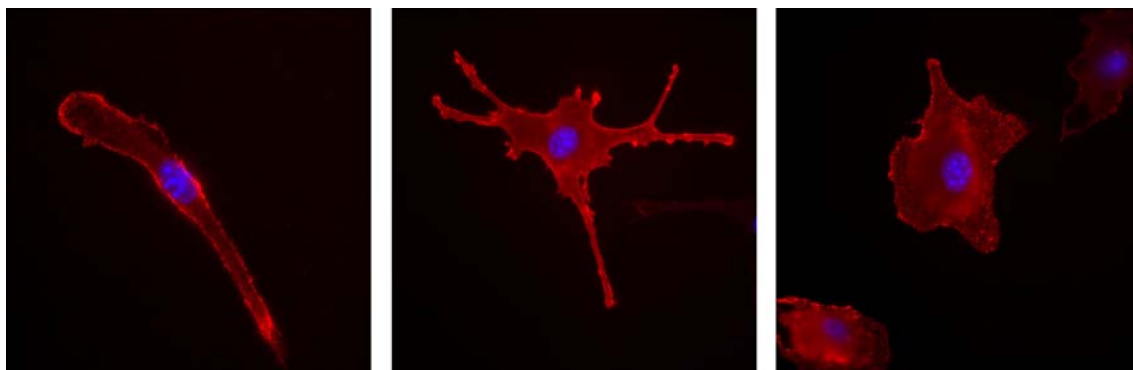


Abb. 13: Makrophagen exprimieren das Oberflächenantigen *CD11b*. Sie besitzen den typischen dendritischen Charakter und können in ihrer Gestalt stark variieren (CD11b rot und Zellkern blau dargestellt).

Fütterung mit Beads

Multicolorbeads: Fluoresbrite Polychromatic 500 nm; Kat.: 19507, Polysciences Inc.

Die Fähigkeit der Makrophagen zur Phagozytose wird mit Hilfe von kleinen, fluoreszierenden Latexkügelchen (Beads) überprüft. Dazu werden die Zellen auf Deckgläsern in 35 mm Schalen ausgesät und anschließend 8 µl Beads in 2 ml Medium für 4 Stunden zugegeben. Nach der Fixierung kann man unter dem Fluoreszenzmikroskop die aufgenommenen Beads im Cytoplasma der Makrophagen beobachten (Abb. 14). Diese Methode kann auch mit der Cd11b-Immunofärbung kombiniert werden.

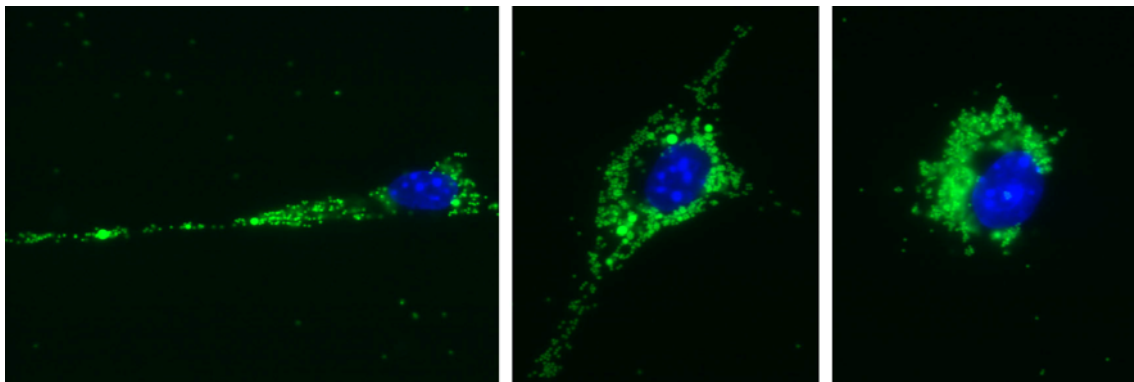


Abb. 14: Mittels fluoreszierender Beads (grün) kann die Phagozytose-Fähigkeit von Makrophagen überprüft werden. Die Latexkügelchen werden von den Zellen aus dem Medium aufgenommen und verteilen sich gleichmäßig im Cytoplasma um den Zellkern (blau).

Anhand der beschriebenen Nachweismethoden konnte eine sehr hohe Reinheit der in vitro differenzierten Kultur gezeigt werden. Bei annähernd 100% der Zellen handelte es sich tatsächlich um Makrophagen. Die absolute Anzahl der Zellen war jedoch relativ gering.

2.1.9 Isolation von Lymphozyten aus peripherem Blut von Maultier, Pferd und Esel

Für die Herstellung von 2D- und 3D-Präparaten der drei Spezies Maultier, Pferd und Esel benötigt man jeweils Vollblut aus welchem die Lymphozyten isoliert werden. Je zwei Tieren einer Art wird dazu venöses Blut abgenommen und getrennt aufbereitet, um eine Kontrolle zu haben. Für einen Ansatz benötigt man ca. 15 ml. Je nach Anzahl der benötigten Präparate ist es ratsam mehrere Ansätze vorzubereiten.

Material für die Isolation, Stimulation und Fixierung von Lymphozyten	Hersteller
Heparin	Braun, Melsungen
Hanks Salz Lösung H2387	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ficoll-Paque PLUS	Amersham Biosciences, Freiburg
RPMI 1640 Medium	Biochrom, Berlin
FCS, S 0115	Biochrom, Berlin
Poly-L-Lysin (10mg/ml), MW150000, P1399	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Leucosep-Röhrchen	Greiner, bio-one

Lymphozyten-Medium für die Stimulation	Konzentration	Hersteller
RPMI 1640 Medium	-	Biochrom, Berlin
FCS, S 0115	15%	Biochrom, Berlin
Pokeweed Mitogen (Kat.: M5060)	0,4 µg / 5 ml	Biochrom, Berlin
Phytohemagglutinin (Kat.: M5040)	2,4 µg / 5 ml	Biochrom, Berlin
Lymphozyten-Medium vor der Fixierung	Konzentration	Hersteller
RPMI 1640 Medium	-	Biochrom, Berlin
FCS, S 0115	15%	Biochrom, Berlin

Das entnommene Blut wird sofort mit Heparin vermischt, um eine Gerinnung zu verhindern. Die Auftrennung der Blutbestandteile geschieht mit Hilfe einer Dichtegradienten-Zentrifugation in Ficoll-beschichteten Leucosep-Röhrchen. Diese Röhrchen enthalten eine poröse Trennscheibe aus Polyethylen. Erythrozyten und Granulozyten können aufgrund ihrer höheren Dichte diese Trennscheibe und die darunterliegende Ficoll-Lösung durchdringen und sedimentieren am Boden des Röhrchens (rotes Pellet). Lymphozyten besitzen eine geringere Dichte und bilden eine weißliche Trennschicht oberhalb des eingesetzten Ficolls. Darüber steht das gelbliche Blutplasma.

- Je 15 ml Blut werden in ein 50 ml Röhrchen mit 500 µl Heparin gegeben
- Leucosep-Röhrchen mit 15,5 ml Ficoll-Lösung befüllen und 1 min bei 350 g zentrifugieren
- Heparin/Blut mit 10 ml Hanks-Lösung versehen und schütteln
- Verdünntes Blut in Leucosep-Röhrchen pipettieren
- 10 min bei 600 g (RT) zentrifugieren
- Überführung der gelblichweißen Trennschicht (buffy coat) mit den mononukleären Zellen in ein neues 50 ml Röhrchen (Pasteurpipette)
- Zugabe von 10 ml Hanks-Lösung
- 10 min bei 160 g (RT) zentrifugieren
- Überstand verwerfen und Zellpellet im verbleibenden Überstand (ca. 0,5 ml) resuspendieren; Waschschrift mit Hanks-Lösung wiederholen
- Überstand verwerfen und Zellpellet in 5 ml Kompletmedium resuspendieren

Anschließend wird eine Zellkultur etabliert und die Lymphozyten stimuliert:

- Befüllung einer Zellkulturflasche mit 7,5 ml Medium
- Zugabe von 100 µl PWM (0,4 µg / 5ml) und 100 µl PHA (2,4 µg / 5 ml); mischen
- Flaschen für 3-4 Tage in den Inkubator stellen

Für ein 3D-Zellkern-Präparat werden die angereicherten Lymphozyten auf Poly-L-Lysin behandelten Deckgläsern ausgesät (Mazia 1975). Das bewirkt eine Anheftung der freischwimmenden Zellen, da dieses basische Aminosäurepolymer die Oberflächenladung des Glases vermindert und so die Interaktion mit den Proteinen der Zelloberfläche erleichtert. Dafür wird Poly-L-Lysin

in bidestilliertem Wasser zu einer Endkonzentration von 1,25 mg/ml verdünnt. Deckgläser werden auf einen Tropfen Polylysinlösung gelegt und eine Stunde bei RT inkubiert. Danach werden sie zweimal in ddH₂O gewaschen und unter der sterilen Werkbank getrocknet. Erst danach wird das Medium mit den Zellen in entsprechender Verdünnung zugegeben. Lymphozyten benötigen etwa eine Stunde, um auf der beschichteten Oberfläche festzuwachsen.

Für die Herstellung von 2D-Metaphase-Präparaten werden die Zellen wie in 2.3.4 beschrieben weiterbehandelt.

2.2 Transfektion von mES-Zellen

Es wurde versucht, mES-Zellen der Linien CCE und TFL1 stabil mit dem lac-Operator/lac-Repressor System zu transfizieren. Dazu benötigt man zwei verschiedene Plasmide. Eines der beiden sorgt für die Expression eines GFP-lac-Repressor Fusionsproteins. Durch eine Kernlokalisationssequenz erscheint der Zellkern nach erfolgreicher Transfektion im Fluoreszenzmikroskop grün gefärbt. Das zweite Plasmid trägt acht lac-Operator Oktamere, insgesamt also 64 Wiederholungseinheiten, die den lac-Repressor-GFP Proteinen als Bindungsstellen dienen. Werden beide Plasmide stabil transfiziert, so weisen diese Zellen punktförmige GFP-Signale auf, welche die Integrationsorte der lac-Operatoren kennzeichnen. Die Zahl der Signale in verschiedenen Zellen eines Transfektionsexperiments ist variabel. Subklonierungsschritte sollen zu stabilen Zelllinien mit definierten Integrationsorten führen. Dieses System wurde bereits erfolgreich zur Untersuchung übergeordneter Chromatinstrukturen in Hefe und Hamsterzellen (Robinet 1996), sowie in Mauszellen (Dietzel 2004) verwendet. Auch die Struktur von Metaphasechromosomen wurde damit schon genauer betrachtet (Dietzel 2001). In dieser Arbeit sollte die Lage und Größe der Fluoreszenzsignale in vivo und in fixierten Zellen untersucht werden. Aus den transfizierten ES-Zellen sollten über verschiedene Differenzierungswege Zelltypen wie Makrophagen oder erythroide Vorläuferzellen gewonnen werden, deren Signale mit denen der Ausgangszellen verglichen werden können. Dies sollte zu Erkenntnissen bezüglich der Organisation des Chromatins in unterschiedlichen Zelltypen bzw. der Umordnung während der Differenzierung führen.

2.2.1 Verwendete Plasmide

lac-Repressor Plasmide

Das ursprüngliche lac-Repressor Konstrukt **p3'SS-Dimer-ClonEGFP** ((Tumbar 1999); siehe Abb. 15) stammt aus dem Labor von A. Belmont (University of Illinois, USA). Es enthält eine Sequenz für GFP und Hygromycin-Resistenz.

Eine gelb fluoreszierende Variante **EYFP-F46L** (Nagai 2002) wurde von Manja Ziegler im Labor von R. Brack-Werner (GSF, München) anstatt des EGFP in den ursprünglichen Repressor einkloniert und zur Verfügung gestellt.

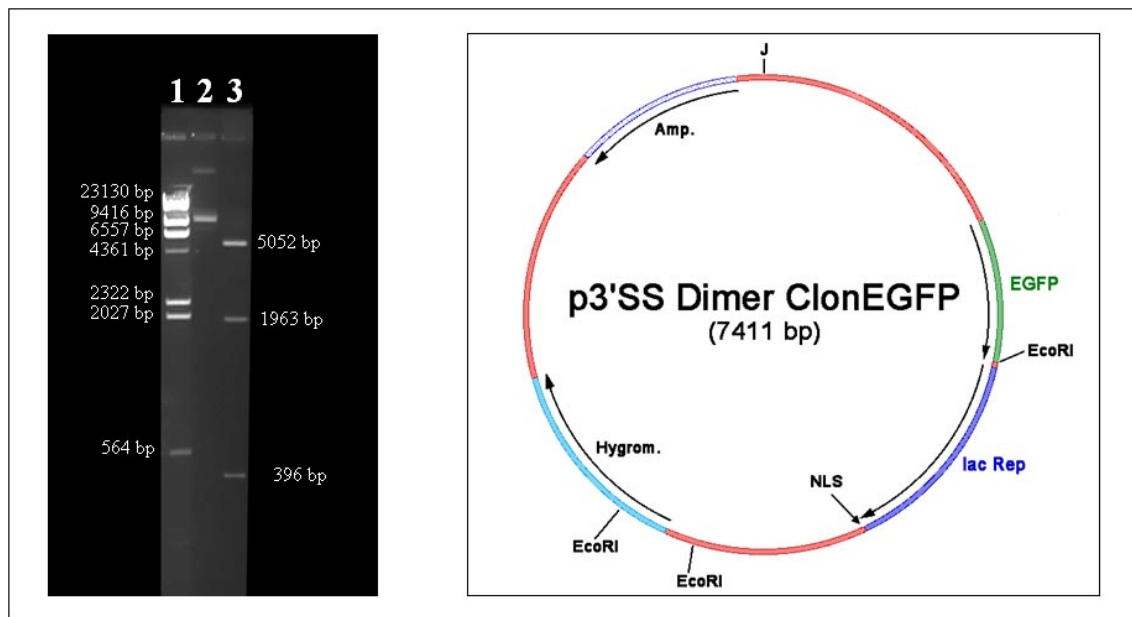


Abb. 15: Lac-Repressor Konstrukt (p3'SS-Dimer-ClonEGFP) und Gelelektrophorese nach Restriktionsverdau. Spur 1: λ HindIII Längenstandard; Spur 2: unverdautes Plasmid; Spur 3: EcoRI-Verdau des 7411 bp großen Plasmids führt zu drei Fragmenten (5052 + 1963 + 396 bp).

lac-Operator Plasmide

Als lac-Operator wurde das Plasmid **pPS-8.8** ((Dietzel 2004); Abb. 16, links) aus dem Labor von A. Belmont verwendet. Es enthält acht lac-Operator Wiederholungseinheiten und neben Ampicillinresistenz keine weiteren Resistenzgene.

Die von S. Dietzel klonierte Variante **pPALZ8.8** (Abb. 16, rechts) wurde ebenfalls verwendet. Es handelt sich dabei um ein Konstrukt aus einer pSV2-Vektorsequenz mit Neomycinresistenz und dem humanen β -Globin Promotor (Übersicht s. Higgs 1998) mit der zugehörigen μ LCR, bestehend aus HS1 bis HS4. Diese vier „hypersensitive sites“ sind maßgeblich als Enhancer an der Expression des β -Globins beteiligt. Sie ermöglichen außerdem eine korrekte, gewebe-spezifische Regulierung der β -Globin Transgene, in Abhängigkeit von der Kopienzahl, jedoch unabhängig vom Ort der Integration (Bulger 1999; Schubeler 2000). Die verwendete 2,5 kb μ LCR ist fast vollständig auf die vier HS-Regionen reduziert. Sie besitzt dennoch volle Funktionsfähigkeit (Talbot 1989; Collis 1990). An den Promotor ist das lacZ-Gen gekoppelt (Robertson 1996). Es dient als Reportergen, da das Produkt β -Galactosidase sehr stabil und einfach zu detektieren ist. Dieses Konstrukt ist an eine Wiederholungssequenz von lac-Operatoren gekoppelt, die als Anheftungsstelle für das exprimierte lac-Repr.-GFP/YFP Protein dient.

Es wurde bereits gezeigt, dass die Expression des humanen β -Globin Transgens auch in Mauszellen stattfindet, beispielsweise bei einer chemisch induzierten Differenzierung von pPALZ8.8-transfizierten MEL-Zellen (Dietzel 2004). Die Idee der Transfektion von ES-Zellen mit diesem Konstrukt ist es, ein System zu erhalten, in dem nicht nur eine beliebige Integrationsstelle im Genom markiert wird, so wie es bei pPS-8.8 der Fall ist, sondern zusätzlich ein induzierbares Transgen. Die Induktion des β -Globin Promotors bzw. des Reportergens soll dabei durch Differenzierung der ES-Zellen zu hämatopoetischen Progenitorzellen erreicht werden.

Um ein deutliches Fluoreszenzsignal zu erhalten, sind mehr als 64 lac-Operator Einheiten bzw. eine mehrfache, tandemartige Integration des Plamids hilfreich (Robinett 1996).

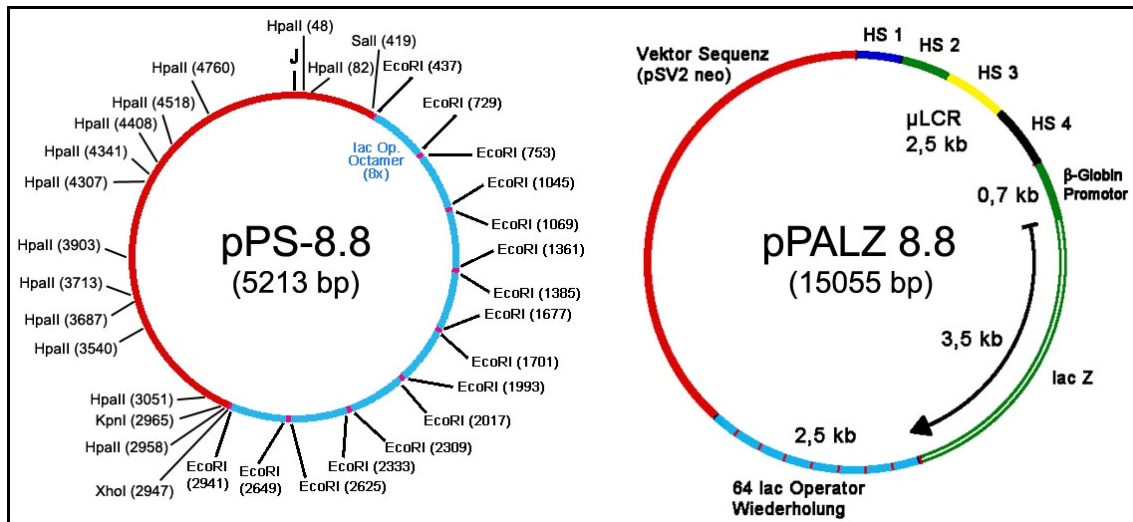


Abb. 16: Die in den Transfektionsansätzen verwendeten lac-Operator Konstrukte pPS-8.8 und pPALZ8.8. Ersterer wurde auch für die Klonierung des neuen Plasmids pLys-8.8 verwendet (siehe 2.2.2 und Abb. 30) und zeigt die dabei verwendeten Restriktionsschnittstellen Sall und HpaII, sowie weitere Schnittstellen für den anschließenden Kontrollverdau.

Reporterplasmide

Anstatt einer Cotransfektion von lac-Operator und lac-Repressor, wurden auch beide Plasmide getrennt voneinander transfiziert, um eine bessere Effizienz zu erreichen. Im Gegensatz zu p3'SS und pPS-8.8 besitzt pPALZ8.8 neben Resistenz gegen Ampicillin keine weiteren Resistenzgene und muss deshalb zusammen mit einem Reporterplasmid transfiziert werden. Dafür wurde zunächst **pSV2neo** (<http://www.atcc.org/>; plasmid37149) mit Neomycinresistenz verwendet. Dessen Promotor ist jedoch für die Expression in ES-Zellen nicht besonders geeignet (Katoh 1987). Deshalb wurde in späteren Versuchen mit **pMC1neo** (Stratagene, USA), sowie **pPGKpuropA** mit Puromycinresistenz (von C. Bonifer, Leeds, UK) cotransfiziert.

Alle verwendeten Plasmide wurden im E.coli-Stamm DH5 α kultiviert bzw. in diesen nach Anleitung des Herstellers (Max Efficiency DH5alpha Competent Cells, Invitrogen) einkloniert und in LB-Flüssigkultur mit Ampicillin vermehrt. Die Isolation der Plasmid-DNA erfolgte mit dem QIAfilter-Plasmid-MaxiKit von Qiagen (Kat. Nr. 12262), um eine möglichst hohe und saubere Ausbeute zu erreichen.

Anhand eines Restriktionsverdaus und anschließender Gelelektrophorese wurden die Eluate auf das Vorhandensein der entsprechenden Plasmide geprüft.

2.2.2 Klonierung des Plasmids pLys-8.8

Neben den bereits erwähnten Konstrukten wurde im Rahmen dieser Arbeit ein weiteres Plasmid neu kloniert. Es handelt sich dabei um das 19764 bp große **pLys-8.8** mit einer Sequenz für Lysozym und einer Wiederholungssequenz von 64 lac-Operatoren (siehe Abb. 30). Ziel dieser Neuklonierung war es, ein in vivo markierbares und, durch Differenzierung in Makrophagen, induzierbares Transgen für ES-Zellen zu erhalten.

Bei den beiden dafür verwendeten Ausgangsplasmiden handelt es sich um pPS-8.8 (siehe 2.2.1) mit 64 lac-Operator Einheiten und pPolyIII-I-Lys. Letzteres ist ein Vektor mit Lysozymgen (Abb. 17). Es stammt ursprünglich aus dem Huhn und wird auch in Maus-Makrophagen, nach Differenzierung transgener ES-Zellen, erfolgreich exprimiert (Übersicht s. Bonifer 1997).

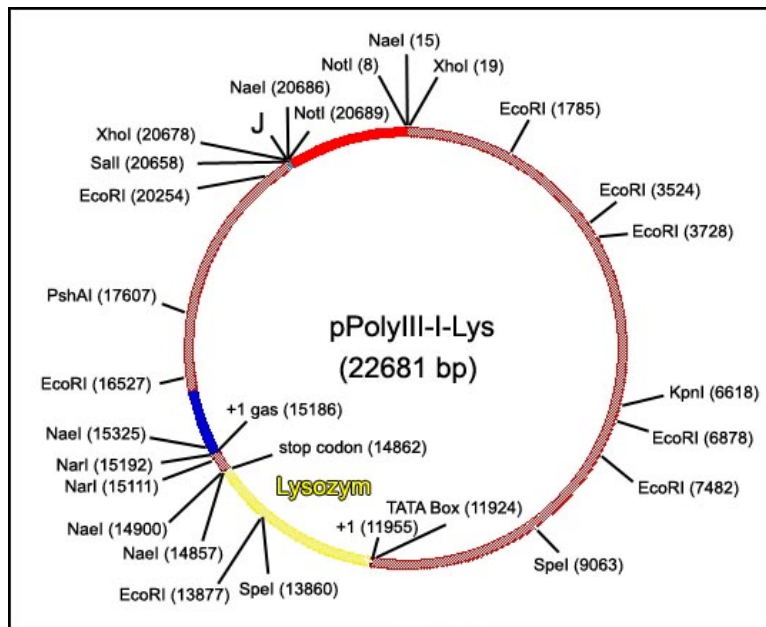


Abb. 17:
Der Vektor pPolyIII-I-Lys enthält ein Lysozymgen mit zugehöriger LCR (locus control region), die eine korrekte Expression unabhängig vom Ort der Integration ermöglicht. Zusammen mit dem lac-Operator Konstrukt pPS-8.8 (Abb. 16) wurde er zu einem neuen Vektor pLys-8.8 fusioniert (Abb. 30). Dargestellt sind u.a. die für die Klonierung benötigten Restriktionsschnittstellen Sall und NarI.

Für die Klonierung wurden pPS-8.8 (Abb. 16) und pPolyIII-I-Lys getrennt isoliert (QIAfilter-Plasmid-MaxiKit, Quiagen). Danach wurden beide Plasmide zunächst mit Sall verdaut, was zu einer Linearisierung führte (Abb. 18a, Spur 1 und Abb. 18b, Spur1). Diese DNA wurde nach einer Gelelektrophorese unter UV-Licht ausgeschnitten und über ein Säulchen mit einem Gelextraktionskit gereinigt (QIAquick-ExtractionKit, Quiagen). Im zweiten Schritt wurde pPS-8.8 mit HpaII und pPolyIII-I-Lys mit NarI geschnitten (Abb. 18b, Spur2). Damit erhielt man die für die Ligation des neuen Plasmids gewünschten Teilsequenzen, nämlich das Lysozymgen mit seinen upstream liegenden Regulatorsequenzen und die lac-Operatoren. Die geschnittene DNA wurde aufgetrennt und die beiden entsprechenden Banden erneut ausgeschnitten, mittels Kit gereinigt und damit von der übrigen Plasmid-DNA getrennt (Abb. 18c). Aufgrund der „sticky ends“ von Sall, sowie der Kompatibilität der NarI- und HpaI-Schnittstellen konnte das neue, gewünschte Konstrukt ligiert werden. Der Ansatz wurde nach Anleitung des Herstellers (Invitrogen) in DH5 α -Zellen inkloniert und zur Selektion auf Ampicillinplatten ausgestrichen. Ein Kontrollverdau mit mehreren Restriktionsenzymen zeigt die für das neue Plasmid erwarteten Banden (Abb. 19).

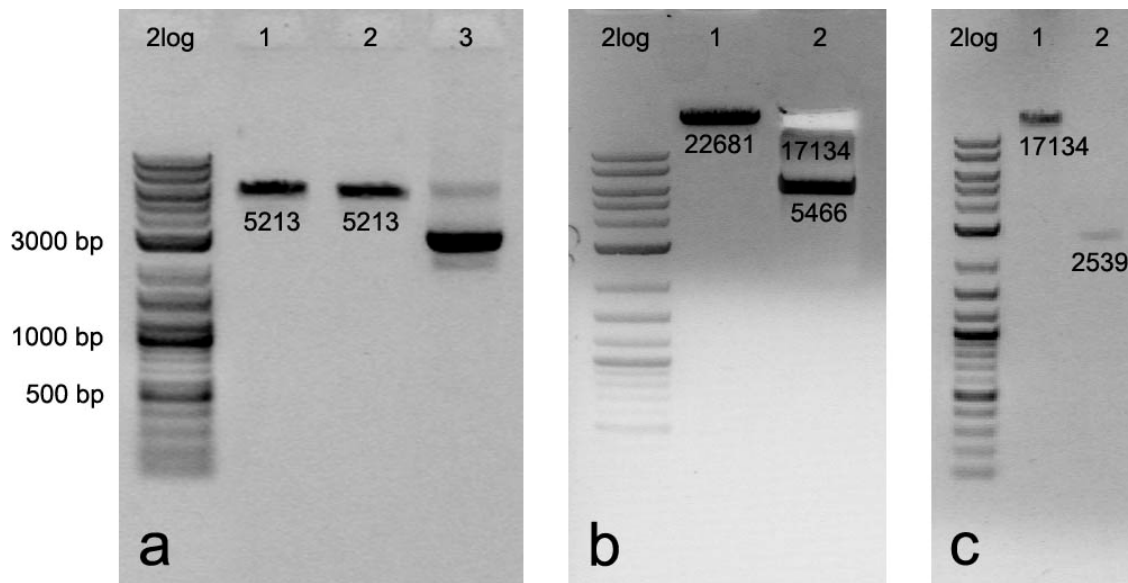


Abb. 18: Verdau der beiden Ausgangsplasmide pPS-8.8 (siehe Abb. 16) und pPolyIII-I-Lys (siehe Abb. 17) für die Neuklonierung von pLys-8.8, ein lac-Operator Konstrukt mit Lysozymgen (siehe Abb. 30). a) Linearisierung von pPS-8.8 mit Sall (Spur 1) oder XhoI (Spur 2) im Vergleich mit dem unverdauten Plasmid (Spur 3). b) Linearisierung von pPolyIII-I-Lys mit Sall (Spur 1) und anschließender Verdau mit NarI führt zu drei Fragmenten: 17134 bp (erhält die gewünschte Sequenz und wurde aus dem Gel geschnitten), 5466 bp und 81 bp (nicht sichtbar). c) Die gewünschten Sequenzen der beiden Plasmide wurden ausgeschnitten und über Säulchen gereinigt: Spur 1 zeigt das 17134 bp Fragment aus pPolyIII-I-Lys mit dem Lysozymgen; Spur 2 das 2539 bp Fragment aus pPS-8.8, welches die lac-Operatoren enthält.

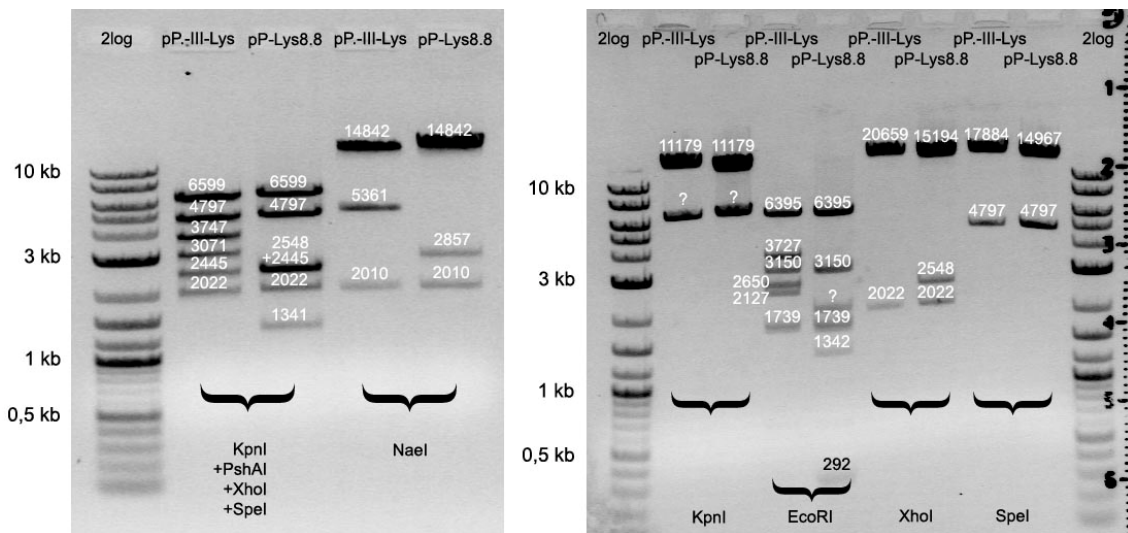


Abb. 19: Kontrollverdau des neu klonierten lac-Operator Konstrukts pLys-8.8 (Schnittstellen siehe Abb. 30) im Vergleich zum Ausgangsplasmid pPolyIII-I-Lys (siehe Abb. 17). Es wurden verschiedene Restriktionsenzyme verwendet. Die Gelelektrophorese zeigt die erwarteten Bandenlängen und bestätigt die korrekte Klonierung. Lediglich drei Banden zeigen eine unerwartete Länge und sind mit einem Fragezeichen gekennzeichnet. Sie sind jedoch durch eine zusätzliche, nicht kartierte EcoRI- und KpnI-Schnittstelle im Ausgangsplasmid pPolyIII-I-Lys erklärbar.

2.2.3 Transfektionsmethoden

Insgesamt wurden drei verschiedene Transfektionsmethoden angewandt: Calcium-Phosphat-Präzipitation, Lipid-basierte Transfektion mit FuGENE und Elektroporation.

Calcium-Phosphat-Präzipitation

Dabei handelt es sich um das häufigste und älteste Transfektionsverfahren. Die zu übertragende DNA wird dabei an ausfallendes Calciumphosphat gebunden, ein Produkt aus Calciumchlorid und Natriumphosphat. Die Aufnahme des kristallinen Copräzipitats in die Zelle geschieht mittels Endocytose. Ein Teil der DNA-Moleküle gelangt in den Zellkern, um dort transkribiert bzw. stabil in die DNA integriert zu werden.

Der Vorteil dieser Methode ist, dass sie einfach und kostengünstig durchgeführt werden kann. Es wird jedoch relativ viel DNA benötigt und die Zugabe des Präzipitats stellt für die Zellen schädlichen Stress dar.

Es wurde nach einem Protokoll von Faust (1994) gearbeitet.

Material für die Calcium-Phosphat Präzipitation
CaCl ₂ (2,5 M)
2×BBS (50 mM BES + 280 mM NaCl + 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ , pH 6.95)
gelatinisierte Petrischalen (6 und 14.5 cm)
Feederzellen (MEF, siehe 2.1.3)
ES-Zell-Medium (siehe 2.1.4)
steriles ddH ₂ O
jeweils 20-50 µg Plasmid-DNA (zirkulär oder linearisiert)
EtOH

Tag 0:

16 h vor der Transfektion ES-Zellen in Petrischalen mit einer Dichte von 2500 Zellen/cm² aussäen. Es wird jeweils eine Schale pro Ansatz und eine zusätzliche Negativkontrolle vorbereitet. Noch werden keine Feederzellen benötigt.

Tag 1:

4 Stunden vor der Transfektion den Zellen frisches Medium geben.

Für eine Cotransfektion je 20-50 µg der Plasmid-DNA (je nach Ansatz) und für eine Transfektion mit nur einem der beiden Plasmide, wenn nötig, eine equimolare Menge eines Reporterplasmids in Ethanol fällen. Die DNA abzentrifugieren und einmal mit 70-prozentigem Ethanol waschen. Pellet in der sterilen Werkbank trocknen und in 450 µl sterilem ddH₂O resuspendieren.

Zu der gelösten DNA 2,5 M CaCl₂ geben und durch auf und ab pipettieren mischen. Anschließend 500 µl 2×BBS zugeben und durch vorsichtige Inversion des Tubes mischen. Nicht vortexen.

Tube mit der transfektionsfertigen DNA 10-20 min bei RT stehenlassen, dann das Präzipitat vorsichtig auf und ab pipettieren.

DNA-Lösung tropfenweise auf die ES-Zellen geben und die Schalen dabei schwenken. Zellen für 20 Stunden zurück in den Inkubator geben. Unter dem Mikroskop sind viele kleine Kristalle zu erkennen.

Tag 2:

Um die Kristalle zu entfernen, die Zellen zweimal mit PBS waschen und frisches Medium zugeben. Zellen für weitere 8-9 Stunden in den Inkubator stellen. Danach Zellen abtrypsinieren und ca. 1:5 in neue Schalen mit Feederzellen splitten. Dies geschieht am besten, indem der Inhalt einer 6 cm Schale auf eine 14,5 cm Schale mit 5,9 facher Oberfläche gegeben wird.

Nach 20 Stunden weiterer Inkubation wird Medium mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum zugegeben. Das Medium wird nun täglich gewechselt. Nach 8-10 Tagen sollten resistente Kolonien erkennbar sein. Wenn alle Zellen in der Negativkontrolle tot sind, werden die Kolonien isoliert.

Transfektion mit FuGENE6

Bei FuGENE6 handelt es sich um ein Lipid-basiertes, jedoch nicht-liposomales, multifaktorielles Transfektionsreagenz der Firma Roche (Roche Applied Science, Mannheim), über dessen genaue Zusammensetzung und Funktionsweise keine Angaben gemacht werden. Laut Hersteller ist es bei geringer Zytotoxizität und hoher Effizienz für die Transfektion vieler eukaryotischer Zellen geeignet. Trotz erhöhtem Serumanteil im Medium, wie es bei ES-Zellen der Fall ist, verspricht es hohe Transfektionsraten.

Vorteil dieser Methode ist eine äußerst einfache und zeitsparende Vorgehensweise. Das Reagenz ist jedoch relativ teuer und war zumindest zum damaligen Zeitpunkt noch nicht ausreichend an ES-Zellen getestet.

Bei der Transfektion wird genau nach Herstelleranweisung vorgegangen. Dazu werden 1-2 µg der jeweiligen Plasmid-DNA in serumfreiem Medium verdünnt und anschließend eine entsprechende Menge FuGENE tropfenweise zugegeben. Der Hersteller schlägt dabei unterschiedliche Verhältnisse von DNA zu Reagenz vor, wobei im Zweifelsfall die Zugabe der höchsten Menge von FuGENE die bessere Wahl ist. Dies entspricht einem Verhältnis FuGENE zu DNA von 6:1, d.h. 6 µl FuGENE werden auf 1 µg DNA angewandt. Nach 15 min Inkubation bei RT wird dieser Transfektionskomplex auf die ca. 50% konfluenten, wachsenden ES-Zellen (besser ohne Feeder) in 6Well-Platten mit Kompletmedium gegeben. Es sollte auch immer eine Negativkontrolle ohne DNA angefertigt werden. Am nächsten Tag wird das entsprechende Selektionsantibiotikum hinzugefügt. Nach einigen Tagen können resistente Klone isoliert werden. Während dieser Zeit ist kein Wechsel des Mediums nötig.

Elektroporation

Bei der Elektroporation werden die Zellmembranen mittels elektrischer Spannungsimpulse durchlässig gemacht. Durch Oberflächenpolarisation kurzfristig entstehende Poren in den Membranen können Fremd-DNA aufnehmen.

Diese Methode bietet die Möglichkeit eine große Zahl von Zellen in kurzer Zeit zu transfizieren. Dabei werden verhältnismäßig wenige Vektorkopien pro Zelle integriert. Das hat besonders bei den lac-Repressor Konstrukten den Vorteil einer geringen Hintergrundfluoreszenz. Elektroporation stellt für die Zellen jedoch einen großen Stressfaktor dar. Bis zu 50% der Zellen werden dabei abgetötet.

Alle Elektroporationen wurden von mir in der Arbeitsgruppe von C. Bonifer an der University of Leeds (UK) durchgeführt.

- ES-Zellen 2-3 Stunden vor der Transfektion mit frischem Medium füttern
- Zellen trypsinieren und gut vereinzeln
- Trypsin mit Medium inhibieren
- 2× in Ca/Mg-freiem PBS waschen
- Pro Ansatz 10^7 Zellen in 800 µl PBS resuspendieren
- Die Zellsuspension in einem Tube mit 100 µg linearisiertem Plasmid in 50 µg Endotoxin-freiem Wasser (Sigma, W3500) vorsichtig vermischen und in eine geeignete 0,4 cm Küvette überführen.
- 5 min bei RT
- Elektroporation bei 260 V, 500 µF; tote Zellen schwimmen oben in der Küvette
- 5 min bei RT
- Inhalt der Küvette in 125 ml ES-Medium transferieren, dabei Küvette 2× mit Medium spülen. Je 25 ml in eine 15 cm Petrischale mit Feederzellen geben.
- Selektion mit entsprechendem Antibiotikum beginnt am Tag nach der Transfektion.
- Resistente Kolonien sind nach ca. 7 Tagen sichtbar.

2.2.4 Transfektionsansätze und Selektion der Klone

Transfektionsansätze

Insgesamt wurden mit jeder Methode mehrere Transfektionen durchgeführt und dabei versucht, die Bedingungen zu optimieren. Aufgrund der hohen Versuchsanzahl wird hier nicht auf jeden Ansatz im Detail eingegangen.

So wurden beispielsweise unterschiedliche FuGENE-Konzentrationen getestet, sowie verschiedene Parameter für die Elektroporation. Es wurde mit und ohne Feederzellen transfiziert, sowie mit unterschiedlicher Dichte von ES-Zellen zu Beginn der Transfektion, um einen Kompromiss zwischen optimalen Stammzell-Bedingungen und ausreichender Transfektionseffizienz einzugehen.

Auch die Mengen und Konzentrationsverhältnisse der Plasmide zueinander wurden variiert. Bei Cotransfektionen wurden sowohl equimolare Mengen des lac-Repressor und lac-Operator Konstrukts verwendet, sowie ein bis zu zehnfacher Überschuss des lac-Operators. Dies sollte bewirken, dass relativ wenig GFP/YFP-Fusionsprotein an eine größere Stelle von lac-Operator-Insertionen bindet, was zu hellen Punktsignalen in Zellkernen mit niedrigem Fluoreszenz-Hintergrund führt. Auch aufeinanderfolgende Transfektionen der beiden Plasmide in unterschiedlicher Reihenfolge wurden durchgeführt.

Selektion und Isolation der Klone

Ebenso wurden unterschiedliche Zeitpunkte für die Zugabe des Selektionsantibiotikums getestet. Die Zugabe erfolgte nach einigen Stunden bis zu mehreren Tagen nach Abschluss der ei-

gentlichen Transfektion. Zuvor wurde für jedes Antibiotikum eine Vergiftungsreihe an ES-Zellen durchgeführt, um die genaue Selektionskonzentration zu ermitteln. Dabei ergab sich für Hygromycin eine Konzentration von 300 µg/ml, für G418 600 µg/ml und für Puromycin 1 µg/ml.

Wenn in der Negativkontrolle alle Zellen tot waren, wurden nach einigen Tagen mit täglichem Wechsel des Selektionsmediums die resistenten Kolonien gepickt. Dies konnten bis zu 100 Klone pro Ansatz sein. Dies geschah mit Hilfe einer gelben Gilson-Pipettenspitze unter dem Phasenkontrastmikroskop in der sterilen Werkbank. Gepickt wurden helle, kleine Kolonien aus ca. 30-40 Zellen. Große, bereits dunkel erscheinende Kolonien sind nicht geeignet, da sie evtl. schon beginnen auszudifferenzieren. Die gepickten Kolonien wurden in vorgewärmtem PBS gewaschen und in jeweils einem Tropfen Trypsin für 5 min in den Inkubator gestellt. Anschließend wurden die Zellen durch auf- und absaugen vereinzelt und der Vorgang unter dem Mikroskop kontrolliert. Dann erfolgte die Zugabe von 1 ml Selektionsmedium und das erneute Aussäen auf Feederzellen in 24Well-Platten. Wells, in denen nach wenigen Tagen erneut Kolonien wuchsen, wurden abtrypsiniert. Davon wurde ein Drittel eingefroren und ein weiteres Drittel für die Beobachtung unter dem Fluoreszenzmikroskop auf ein Deckglas ausgesät, sofern ein lac-Repressor Plasmid im Transfektionsansatz verwendet wurde. Die restlichen Zellen wurden für den Nachweis der Integration von Fremd-DNA auf Gelatine, z.B. in 96Wells, weiterkultiviert.

2.2.5 Nachweis der Integration von Plasmiden

Der Erfolg von Transfektionen wurde zunächst anhand fixierter oder lebender Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop geprüft. Der lac-Repressor macht sich durch einen grün oder gelb fluoreszierenden Kernhintergrund bemerkbar, je nachdem ob er an GFP oder YFP gekoppelt ist. Haben die Zellen auch den lac-Operator aufgenommen, so erscheint dieser durch Bindung des Repressors als punktförmiges Signal.

Die Aufnahme des Plasmids in die Zellen wurde auch mittels PCR geprüft. Dafür wurden in der Datenbank Ensembl (<http://www.ensembl.org>) Primer gesucht und generiert (MWG-Biotech AG), welche bestimmte Teilabschnitte der Plasmid-DNA amplifizieren und somit dem Nachweis von lac-Repressor und lac-Operator in transfizierten Zellen dienen. Dazu musste zunächst die DNA eines Klons isoliert werden.

Es wurden verschiedene Primerpaare verwendet und getestet (Tabelle 1 und Abb. 20) und schließlich für den Nachweis der transfizierten DNA in ES-Zellen verwendet (Abb. 21). Eines dient als Positivkontrolle dem Nachweis von Cytochrom c. Ein weiteres dient dem Nachweis der lac-Repressor Sequenz in den beiden GFP- oder YFP-gekoppelten Repressorkonstrukten. Insgesamt sechs Primerpaare weisen die drei verschiedenen lac-Operator Plasmide nach. Eines umspannt das lacZ-Gen in pPALZ8.8. Ein weiteres erzeugt in pPALZ8.8 und pPS-8.8 Amplifikate unterschiedlicher Länge, indem einer der beiden Primer jeweils zwischen den Operator-Wiederholungseinheiten und der andere downstream im direkt angrenzenden Vektorbackbone bindet. Vier Primerpaare dienen dem Nachweis des neuen pLys-8.8, indem sie an verschiedene Bereiche des Plasmids binden.

Die Primer wurden nach folgenden Kriterien ausgewählt: hoher GC-Gehalt ($T_m > 60^\circ\text{C}$), ca. 30 bp Länge und ein oder zwei G/C am 5' Ende.

Primernamen	Sequenz	Bindestelle des Primers	Länge des Amplifikats
Positivkontrolle:			
MZcytc5	5'-CCA TCC AAC ATC TCC GCA TGA TGA AA-3'	binden auf genomischer DNA, Amplifikation von Cytochrom c	359 bp
MZcytc3	5'-GCC CCT CAG AAT GAT ATT TGG CCT CA-3'		
Nachweis des lac-Repressors p3'SS Dimer ClonEGFP:			
sdlacre5	5'-CCC ATC AAC AGT ATT ATT TTC TCC CAT GAA-3'	3' und 5' Ende der lac- Repressor Sequenz	388 bp
sdlacre3	5'-GGA TAT AAC ATG AGC TGT CTT CGG TAT CGT-3'		
Nachweis des lac-Operators pPALZ 8.8:			
SDlacz5	5'-CAT TTA ATG TTG ATG AAA GCT GGC TAC AGG-3'	3' und 5' Ende des lacZ- Gens	306 bp
SDlacz3	5'-CAA CAT GGA AAT CGC TGA TTT GTG TAG TC-3'		
Nachweis der lac-Operatoren pPALZ 8.8 und pPS-8.8:			
MZlacOp5	5'-GGA ATT CCT CGA CTC TAG AGG CGC CGA ATT CC3'	MZlacOp5 bindet 8× zwi- schen den lac-Op Octame- ren, SDpsv2n3 in der pSV2neo Sequenz	411+727+1043 +1359+1675+1 991+2307 bp
SDpsv2n3	5'-GCT TCC CAC ATC AAA ATA TTT CCA CAG GTT-3'		
Nachweis des lac-Operators pLys-8.8:			
3000-F	5'-GGT GAA GGT TGG GAT GGG TG-3'	im backbone bei 3332-3351 bp	351 bp
3000-R	5'-TCT CTG CTC AAG GGG TGC TAC-3'	im backbone bei 3663-3683 bp	
9000-F	5'-GCA GTA CTA GTC AGA ACC CTC G-3'	im backbone bei 9058-9079 bp	402 bp
9000-R	5'-ATA GCC AGA ACT GTG CTG TCA C-3'	im backbone bei 9439-9460 bp	
c-lys1	5'-GAT CGT CAG CGA TGG AAA CGG C-3'	am downstream gelegenen Ende des Lysozym-Gens	181 bp
c-lys2	5'-CTC ACA GCC GGC AGC CTC TGA T-3'		
Medig.-F	5'-CGC ATC CCT CAT TAA AAG GAC TAT-3'	upstream der lac-Op Wdh. bei 14944-14967bp	Leiter mit 8 Amplifikaten mit Längen zwischen 316 und 2212 bp
lacOp-R	5'-ACT CTA GAG GCG CCG AAT TCC C-3'	bindet 8× zwischen den Octameren	
oder:			
CHbacS-R	5'-ATC TAC CTG CCT GGA CAG C-3'	downstream der lac-Op Wdh. bei 17781-17853 bp	
lacOp-F	5'-GAA TTC GGC GCC TCT AGA GTC-3'	bindet 8× zwischen den Octameren	

Tabelle 1: Alle in dieser Arbeit verwendeten Primerpaare für den Nachweis der lac-Repressor und lac-Operator Konstrukte.

Isolation der DNA eines Zellklons

Lysis-Puffer	10 mM NaCl + 10 mM Tris-HCl (pH = 7,5) + 10 mM EDTA + 0,5% Sacrosyl + 0,4 mg/ml Proteinase K (immer frisch zugeben)
---------------------	---

- Zellen in 96Well vollständig konfluent wachsen lassen
- Jedes Well 2× mit 100 µl PBS waschen
- 50 µl Lysis-Puffer zugeben
- Platte über Nacht bei 56°C in feuchter Kammer inkubieren
- 1 Stunde abkühlen lassen
- Zugabe von 100 µl EtOH (100%) pro Well; 1 h bei RT
- Wells durch Anpressen von Papiertüchern und Invertieren der Platte vorsichtig entleeren, DNA bleibt am Plastik haften
- Wells 3× mit 70% EtOH waschen, dabei wieder auf Papiertücher entleeren
- DNA in den Wells trocknen lassen und in je 25 µl H₂O oder TE-Puffer resuspendieren

PCR auf isolierter DNA

PCR-Ansatz (50 µl) zum Nachweis von Plasmid-DNA			
Menge	Stoff		
8 µl	DNA (entspricht ca. 0,5 µg; siehe DNA-Isolation oben)		
1 µl	5'Primer (20 µM Stocklösung)		
1 µl	3'Primer (20 µM Stocklösung)		
0,5 µl	Polymerase		
5 µl	10× PCR-Puffer		
add 50 µl	H ₂ O		
PCR-Programm			
Temperatur	PCR-Programm	Dauer	Zyklen
94°C	Startdenaturierung	5 min	1×
94°C	Denaturierung	45 sec	30×
60°C	Anlagerung der Primer	30 sec	
72°C	Verlängerung / Synthese	x min (1 min pro kb)	
72°C	Finale Verlängerung	7 min	1×

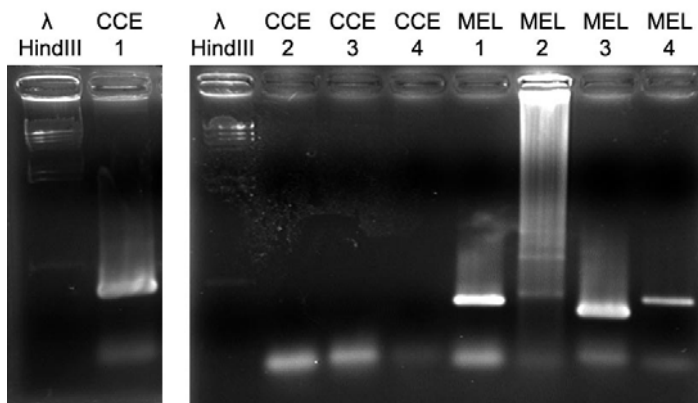


Abb. 20: Test der Primerpaare zum Nachweis des lac-Repressors p3'SS-Dimer-ClonEGFP und des lac-Operators pPALZ8.8 mittels PCR auf genomischer DNA entsprechend transfizierter MEL-Zellen (Dietzel 2004). Genomische DNA der Stammzell-Linie CCE dient als Negativkontrolle. Folgende Primerpaare wurden verwendet: 1) MZcytc5 und MZcytc3 als Positivkontrolle zum Nachweis von Cytochrom c. 2) MZlacOp5 und MZlacOp3, sowie 3) SDlac5 und SDlac3 zum Nachweis des lac-Operators. 4) sdlacre5 und sdlacre3 zum Nachweis des lac-Repressors. Alle Spuren zeigen die erwartete Amplifikatlänge (siehe Tabelle 1).

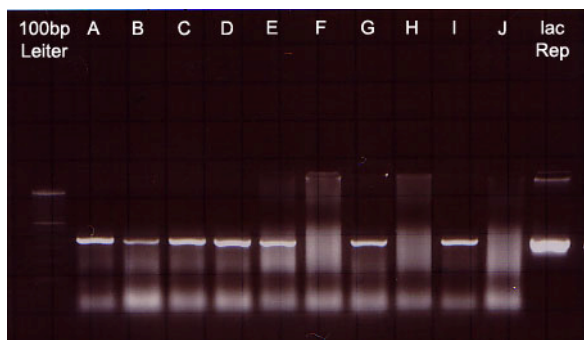


Abb. 21: PCR auf DNA von lac-Repressor transfizierten ES-Klonen (A - J) mit dem Primerpaar sdlacre5 und sdlacre3. Rund zwei Drittel der Klone (in diesem Fall A-E, G und I) haben das Plasmid aufgenommen und zeigen die entsprechende Bande von 388 bp Länge. Ob es sich dabei tatsächlich um stabile Integrationen handelt ist fraglich. Zumindest wird das Transgen bereits nach kurzer Zeit nicht mehr exprimiert und die benötigte GFP-Fluoreszenz geht verloren (siehe 3.1.2).

2.3 Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung (FISH) und Antikörper-nachweis

Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) ist ein Verfahren, um definierte Nukleinsäuresequenzen in einzelnen Zellen (3D) oder auf Metaphase-Chromosomen (2D) nachzuweisen (siehe 1.2).

Die Methode beruht auf der Fähigkeit basenspezifischer Paarung einzelsträngiger DNA (oder RNA). Durch Aufschmelzen werden die beiden Stränge der nachzuweisenden DNA getrennt und mit künstlich hergestellten Sonden hybridisiert. In dieser Arbeit wurden mit Haptenen indirekt markierte DNA-Sonden verwendet und mittels Fluoreszenz-gekoppelter Antikörper nachgewiesen.

2.3.1 Gewinnung der DNA-Sonden

In dieser Arbeit wurden sehr unterschiedliche DNA-Sonden aus verschiedenen Quellen verwendet.

Chromosomenpaints

Bei einem sogenannten Paint handelt es sich um eine DNA-Sonde für ein ganzes Chromosom. In dieser Arbeit wurden Paints für die Maus-Chromosomen 5, 7, 10, 11 und 17 eingesetzt. Sie stammen aus dem Labor von N. Carter (Sanger Institut, Cambridge, UK) und J. Wienberg (Chrombios, Raubling). Ausgangsmaterial waren FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter) - sortierte, mitotische Chromosomen (Rabbitts 1995), die mittels DOP (degenerate-oligonucleotide-primed) - PCR (Telenius 1992) amplifiziert wurden. Die dabei verwendeten Primer besitzen variable Sequenzen und ermöglichen die Vervielfältigung des chromosomalen Ausgangsmaterials, indem auf niederstringente hochstringente Zyklen folgen. Dabei spricht man von primärer PCR.

Das Material für diese Arbeit entstammt sogenannten sekundären PCRs, die der weiteren Amplifikation des Materials dienen und bei denen es keinen stringenten Schritt gibt. Davon ausgehend werden weitere sekundäre PCRs durchgeführt.

Universeller Mastermix für eine sekundäre DOP-PCR (500 µl)			
Menge	Stoff	Endkonzentration	
50 µl	10× PCR-Puffer	50 mM	
10 µl	25 mM MgCl ₂	0,5 mM (gesamt 2 mM)	
50 µl	6 MW-Primer	2 µM	
50 µl	2,5 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP	je 250 µM	
340 µl	H ₂ O bidest	-	
Sekundärer DOP-PCR-Ansatz (50 µl)			
Menge	Stoff		
48,5 µl	Mastermix (siehe oben)		
1 µl	DNA aus primärer oder sekundärer DOP-PCR		
0,5 µl	Taq-Polymerase		
PCR-Programm für sekundäre DOP-PCR			
Temperatur	PCR-Programm	Dauer	Zyklen
94°C	Startdenaturierung	3 min	1×
94°C	Denaturierung	1 min	35×
56°C	Anlagerung der Primer	1 min	
72°C	Verlängerung / Synthese	2 min	
72°C	Finale Verlängerung	5 min	1×

BAC-Klone

Alle BACs (Bacterial Artificial Chromosomes) stammen aus dem BACPAC Resource Center (Oakland, CA, <http://bacpac.chori.org>).

Die acht verwendeten BAC-Klone (Kartierung siehe Abb. 22 und Abb. 23) enthalten je eines der gewünschten Mausgene, die in den folgenden FISH-Experimenten untersucht werden sollten. Sechs davon befinden sich paarweise auf jeweils demselben Chromosom. Auf jedem BAC-Klon liegen noch andere Gene, deren Funktion und Expression berücksichtigt werden muss (siehe 2.4, RT-PCR).

Folgende BACs wurden verwendet:

- Chromosom #5: **RP23-95B6** (*β-Actin*) + **RP23-301A23** (*Albumin*)
- Chromosom #7: **RP24-79I7** (*β-Globin*) + **RP23-368L18** (*CD11b = Itgam*), **RP23-6I17** (BWS = Beckwith-Wiedeman-Syndrom Region)
- Chromosom #10: **RP23-326O5** (*Lysozym*) + **RP23-47G13** (*Myb*)
- Chromosom #11: **RP24-376D9** (*Mpo*)
- Chromosom #17: **RP23-75C13** (*Oct-3/4 = Pou5f1*)

Die Hybridisierungen von RP24-376D9 wurden im Rahmen eines Laborpraktikums von Julia Merz durchgeführt. Die Hybridisierungen von RP23-95B6 und RP23-301A23, sowie die zugehörigen mikroskopischen Aufnahmen wurden im Rahmen einer Diplomarbeit von Alexander Mannes durchgeführt.

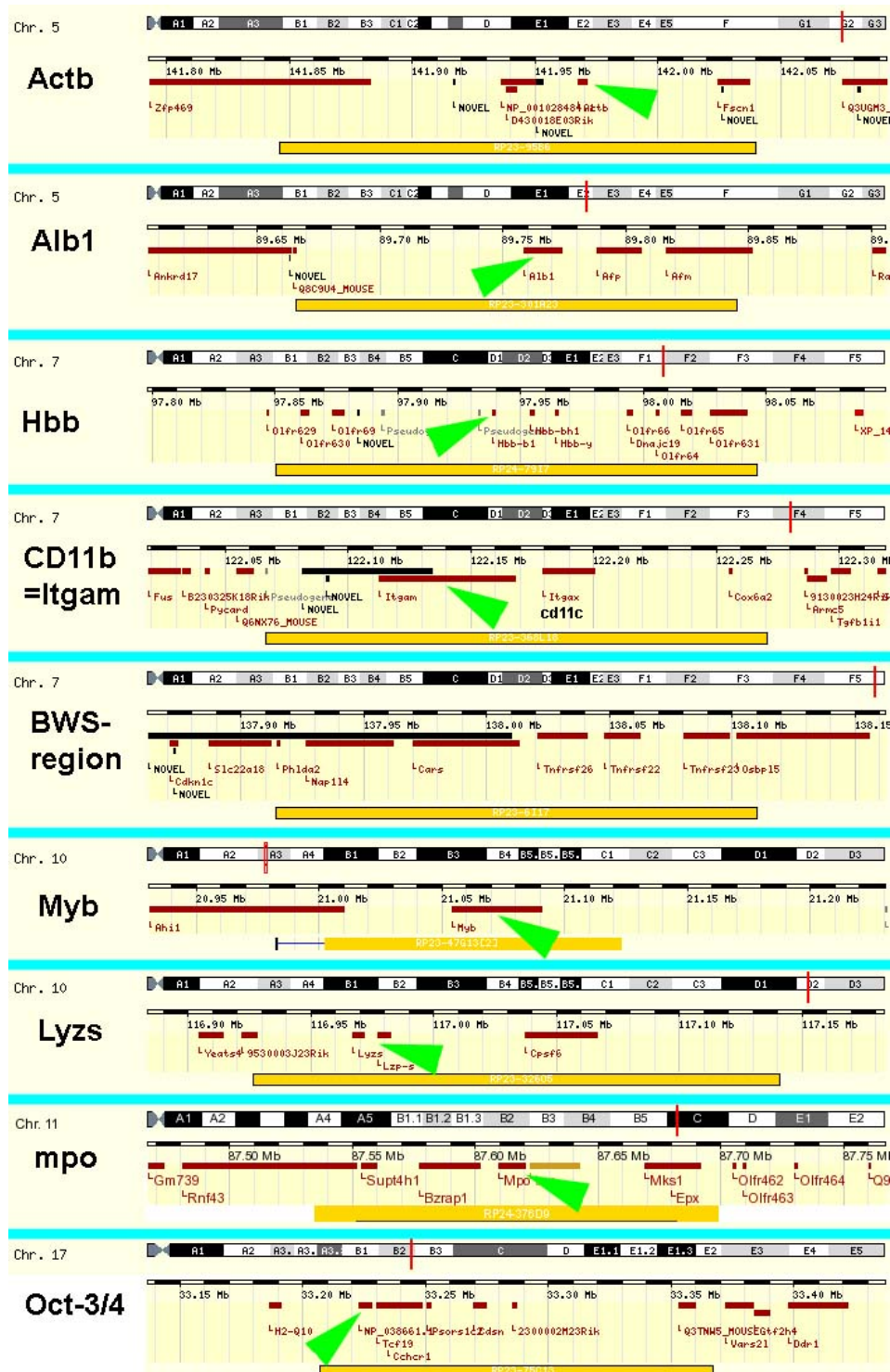
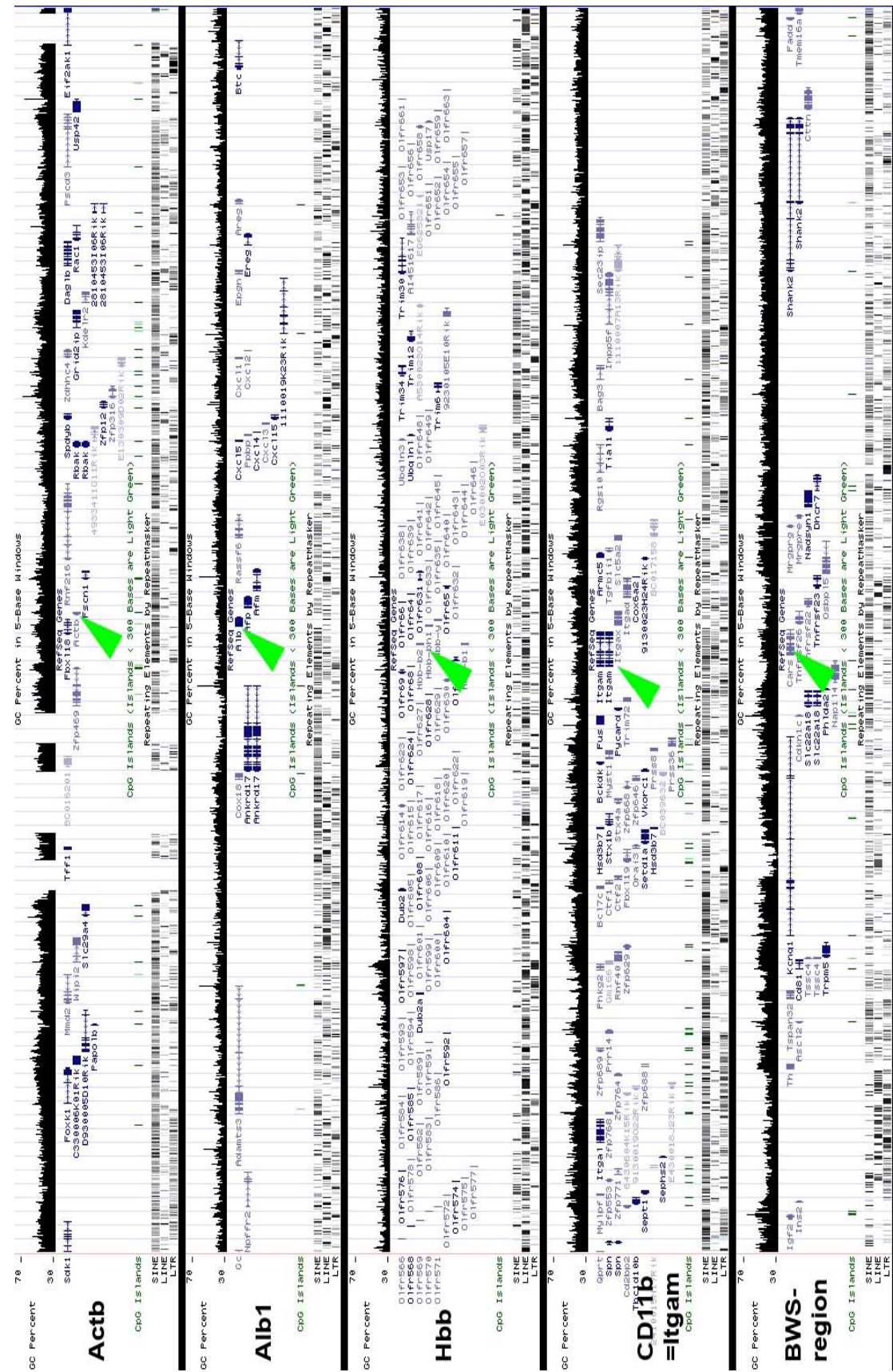


Abb. 22: Karte der untersuchten Genloci. Die chromosomale Lage eines jeden Locus ist mit einer roten Linie markiert. Darunter ist die 300 kb Region um den jeweiligen BAC dargestellt. Der BAC selbst wird durch einen gelben Balken repräsentiert. Bekannte und unbeschriebene Gene sind als rote und schwarze Balken dargestellt, die entsprechenden Namen befinden sich darunter. Das für den Locus namensgebende Gen ist durch einen grünen Pfeil hervorgehoben. Alle Daten und Bilder wurden aus www.ensembl.org entnommen.



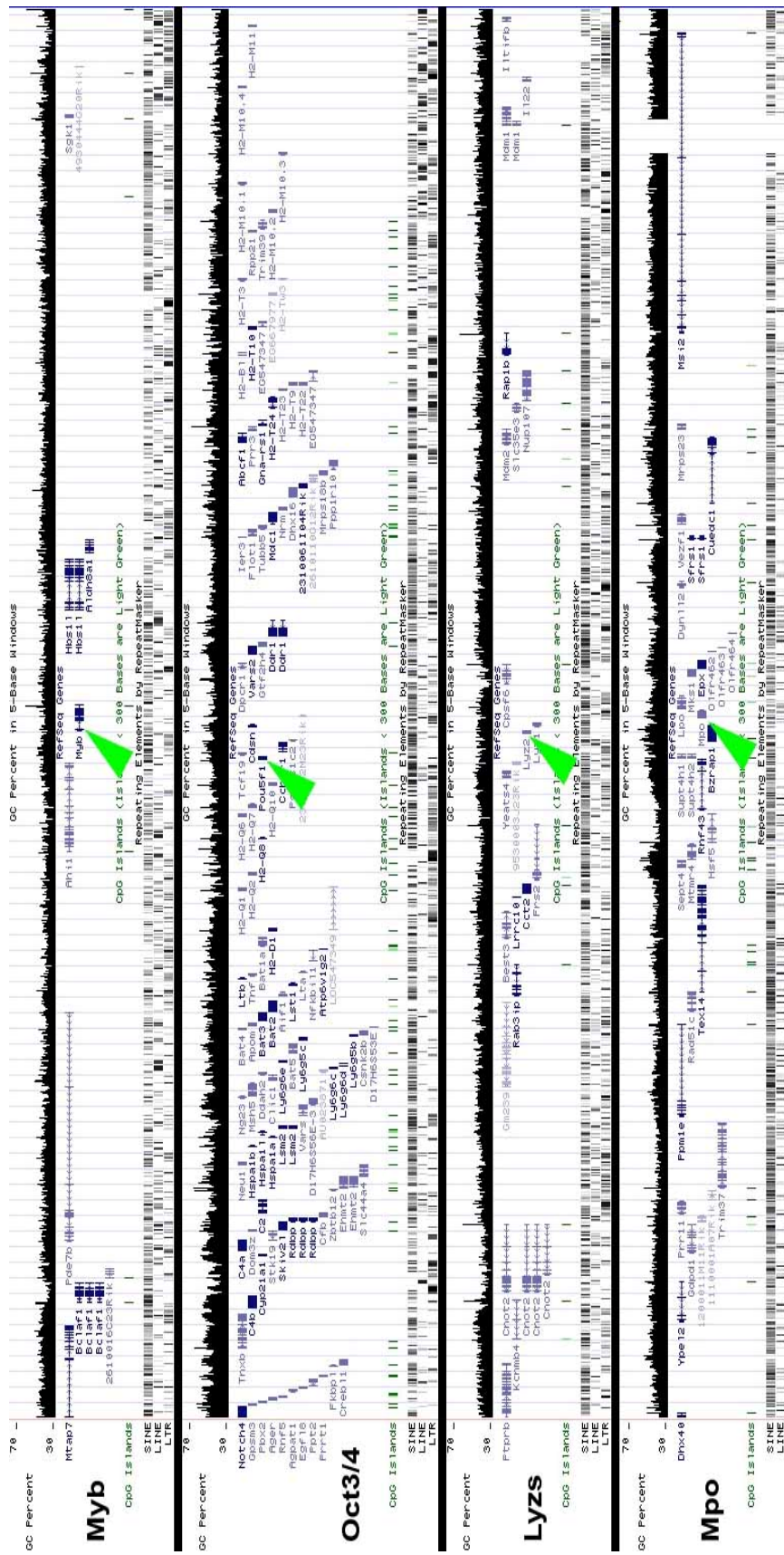


Abb. 23: 2 Mb Fenster um die untersuchten Loci, berechnet von der Mitte des jeweiligen BACs (siehe Abb. 22). Diese Karten zeigen die Verteilung der genomischen Eigenschaften innerhalb dieser Fenster. Für jeden Locus ist folgendes von oben nach unten dargestellt: der GC-Gehalt als Durchschnitt eines 5-Basen Fensters in schwarz (Grundlinie \triangleq 30% und Maximum \triangleq 70%), die Gene mit den entsprechenden Namen in blau, die Verteilung der CpG-Inseln als grüne, vertikale Balken und drei Spuren für SINES, LINES und LTRs in Form grauer, vertikaler Balken. Die gezeigten Eigenschaften sind generell gleichmäßig innerhalb der 2 Mb Fenster verteilt. Eine Ausnahme ist die Dichte der SINES am β -Globin Locus (Hbb), welche in der linken Megabase relativ niedrig und in der rechten relativ hoch ist. Die Karten wurden mit Hilfe des UCSC Genome Browsers (<http://genome.ucsc.edu>) erstellt. Der Abstand zwischen zwei vertikalen Linien beträgt ungefähr 22,2 bp. Das namensgebende Gen ist durch grüne Pfeile hervorgehoben. Die aktuelle Sequenz um das β -Actin Gen beinhaltet vier kleine Lücken, die Sequenz um das Mpo-Gen enthält eine Lücke.

Aus den Stichkulturen der gelieferten BAC-Klone werden Glycerolstocks hergestellt und DNA zur Herstellung von FISH-Sonden isoliert:

Lösungen für die Isolierung von BAC-DNA	
P1	für 50 ml
15 mM Tris, pH 8	0,75 ml 1 M stock (1:60)
10 mM EDTA	1 ml 0,5 M stock (1:50)
100 µg/ml RNase A	5 mg (= 0,5 ml einer 1% Lösung)
H ₂ O	47,75 ml
fertige P1-Lösung steril filtrieren, Aufbewahrung bei 4°C	
P2	für 10 ml
0,2 N NaOH	2 ml 1 N NaOH stock (= 2 g in 50 ml H ₂ O)
1% SDS	1 ml 10% SDS stock
H ₂ O	7 ml
P2-Lösung frisch ansetzen, steril filtrieren, Aufbewahrung bei RT	
P3	für 50 ml
3 M KAc (Kaliumacetat); pH 5,5	14,7 g
HAc, um den pH-Wert einzustellen	~ 5,75 ml
H ₂ O	add 50 ml
fertige P3-Lösung autoklavieren, Aufbewahrung bei 4°C	
sonstiges:	
5 ml LB-Medium pro BAC-Kultur	
entsprechende Antibiotika (z.B. 20 µg/ml Chloramphenicol)	
50% Glycerol (autoklaviert)	

- Mit einer sterilen Öse einen kleinen Tropfen der Stichkultur auf LB-Platten mit entsprechendem Antibiotikum ausplattieren und über Nacht bei 37°C inkubieren.
- Mit einer sterilen Pipettenspitze eine einzelne Kolonie isolieren und in 5 ml LB-Medium geben. In einem 15 ml Röhrchen über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler hochziehen.
- Für Glycerolstocks je 300 µl 50%iges Glycerol in ein Kryoröhrchen vorlegen und 300 µl der Übernachtskultur zugeben. Vorsichtig mittels Pipettieren mischen. Für eine Stunde auf Eis stellen, damit das Glycerol die Bakterienwände durchdringen kann, anschließend auf -80°C.
- Die restliche Übernachtskultur bei höchster Geschwindigkeit abzentrifugieren und den Überstand verwerfen.
- Jedes Pellet in 0,3 ml P1-Lösung resuspendieren und in ein Eppendorf-Tube überführen. 0,3 ml P2-Lösung zugeben und vorsichtig schütteln. Nicht vortexen! 5 min bei RT inkubieren. Die Lösung sollte nach dieser Zeit mehr oder weniger durchsichtig und nicht mehr trüb sein.
- 0,3 ml P3-Lösung zugeben und den Inhalt des Tubes durch 8-10× Invertieren mischen. Ein dickes, weißes Präzipitat aus Protein und bakterieller, chromosomaler DNA fällt aus. Die BAC-DNA befindet sich im Überstand. Inkubation auf Eis für mindestens 5 min.

- Bei maximaler Geschwindigkeit abzentrifugieren, wenn möglich bei 4°C. Danach Tubes auf Eis stellen und den Überstand in ein frisches Tube überführen. Diesen Schritt wiederholen.
- 0,8 ml eiskaltes Isopropanol zugeben, um die BAC-DNA zu fällen. Inhalt durch Invertieren des Tubes mischen. Für mindestens 5 min auf Eis stellen. Die Proben können an dieser Stelle auch bei -20°C eingefroren werden.
- 15 min zentrifugieren, wenn möglich bei 4°C.
- Überstand abnehmen und 0,5 ml kaltes 70% EtOH zugeben. Tubes mehrmals invertieren, um die DNA-Pellets zu waschen. 5 min zentrifugieren und diesen Waschschrift wiederholen.
- Überstand mit Pipette vollständig abnehmen und Pellet bei RT trocknen lassen. Das Pellet wird dabei durchsichtig. 30 µl steriles ddH₂O zugeben und Pellet evtl. durch Erwärmen und leichtes Schütteln resuspendieren.
- Konzentration der DNA am Photometer bestimmen oder anhand eines Gels abschätzen.

Genomische DNA

Aus gesamtgenomischer DNA von Esel und Pferd wurden ebenfalls FISH-Sonden hergestellt, um diese auf Lymphozyten des Maultiers zu hybridisieren. Die DNA dafür musste zunächst aus Gewebe isoliert, dann amplifiziert und gereinigt werden.

Material für DNA-Isolierung	Zusammensetzung / Konzentration
Lebergewebe	4 g pro Ansatz
Lysis-Puffer	2% SDS in TE-Puffer + 0,1 M EDTA + 0,2 M Tris/HCl pH 8
NaCl	5 M
Proteinase K	15,6 mg/ml (stock: 25 mg/ml; von Roche)
RNase A	1% RNase (stock: 100 mg/ml; von Qiagen)
EtOH	70% und 100%

Ausgangsmaterial für die DNA-Isolierung war Lebergewebe von Pferd und Esel. Leber besitzt eine hohe Zelldichte und somit einen vergleichsweise hohen DNA-Gehalt (10-30 µg DNA in 25 mg Lebergewebe laut „Genomic DNA Purification“ von Qiagen). Die verwendete Pferdeleber stammte aus einer Metzgerei, ein Stück Eselleber wurde von Barbara Bank (Frankfurt am Main) zur Verfügung gestellt.

Zunächst wird das Lebergewebe mit einem Skalpell in kleine Stücke geschnitten und dann mit einem Messerhomogenisator weiterbehandelt. Die Homogenisate werden in einem 50 ml Tube bis zur 25 ml Marke mit Lysis-Puffer aufgefüllt und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Anschließend werden 200 µl bzw. 5 mg Proteinase K zupipettiert und über Nacht bei 50°C inkubiert. Die Fällung der abgebauten und denaturierten Proteine erfolgt durch Zugabe von 10 ml NaCl Lösung, deren Abtrennung durch eine nachträgliche Zentrifugation bei 2300 g für 30 min. Je 15 ml der Überstände werden in neue Röhrchen überführt und mit dem doppelten Volumen (30 ml) kaltem absolutem Ethanol versehen. Die gefällte DNA wird durch eine nachfolgende Zentrifugation bei 4800 rpm für 15 min sedimentiert. Die Pellets werden zweimal mit 70-prozentigem EtOH gewaschen und anschließend getrocknet.

Für den Verdau von RNA werden die Pellets durch leichtes Schütteln bei 37°C in je 1 ml Lysis-Puffer gelöst. Die einzelnen Ansätze jeder Spezies werden vereinigt und RNase A mit einer

Endkonzentration von 60 µg/ml zugegeben. Es erfolgt eine zweistündige Inkubation bei 37°C auf dem Schüttler (100 rpm).

Um verbliebene Protein- und Lipid-Verunreinigungen zu entfernen, wird die DNA mittels Phenol-Chloroform-Präzipitation gereinigt. Dabei wird nach einem leicht abgewandelten Protokoll von Shirley Reynolds (University of California, San Diego) vorgegangen (<http://hedricklab.ucsd.edu/Protocol/PhenChlor.html>):

- Zugabe an gleichem Volumen Phenol / Chloroform zu der jeweiligen Probe
- Mischen, jedoch nicht vortexen
- Obere, wässrige Schicht abnehmen und Schritt evtl. wiederholen
- Gleiches Volumen an Chloroform zugeben und mischen
- 3 min bei 3200 rpm zentrifugieren
- Obere, wässrige Schicht abnehmen und diesen Schritt evtl. 1× wiederholen
- 1/10 Volumen 3 M NaOAc (Endkonzentration 0,3 M) zugeben und mischen
- Zweifaches Volumen eiskaltes 100% EtOH zugeben
- 25 min auf Eis inkubieren
- 10 min bei 4°C zentrifugieren und Überstand vorsichtig abnehmen
- Pellet zweimal in 70% EtOH waschen und abzentrifugieren
- Überstand abpipettieren und Pellet 1 Std. lufttrocknen

Letztendlich werden die gereinigten Pellets in je 2 ml TE-Puffer bei 37°C und mehrstündigem Schütteln (300 rpm) gelöst.

Im Anschluss an die Isolierung genomischer DNA von Pferd und Esel wird diese mittels Genomphi-DNA-Amplifikation-Kit (Amersham Biosciences) vervielfältigt. Dabei wird genau nach Anleitung des Produkts vorgegangen. Es handelt sich hierbei um eine „whole-genome amplification (WGA)“. Zufällige Hexamer-Primer dienen als Startpunkt für die DNA-Polymerisation durch die Phi29 DNA-Polymerase. Dieses Enzym stammt aus dem Bakteriophagen Phi29, ist hoch prozessiv, besitzt eine geringe Fehlerrate und hervorragende Strangverdrängungs-Eigenschaften. Im Prinzip reicht bereits 1 ng DNA zur Vervielfältigung aus. In der Regel werden jedoch über 50 ng eingesetzt, in diesem Fall rund 200 ng. Mit dieser Methode werden weitere DNA-Isolationen umgangen. Die eingesetzte genomische DNA wird dabei in repräsentativer Weise amplifiziert, ohne Bevorzugung bestimmter Bereiche wie beispielsweise repetitiver Sequenzen (Lasken 2003).

2.3.2 Markierung der DNA-Sonden

Die Sonden werden mit nicht-radioaktiven Molekülen markiert, die in Form von modifizierten dUTPs anstelle von Thymidin teilweise in die DNA eingebaut werden. Im Falle dieser Arbeit wurden lediglich indirekt markierte Sonden verwendet. Dabei kommen Hapten-gekoppelte Nukleotide zum Einsatz, die in einem zweiten Schritt mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen werden, welche ihrerseits an ein Fluorochrom gekoppelt sind. Um Nukleotide mit den

entsprechenden Haptenen (in diesem Fall Biotin = Bio, Digoxigenin = Dig und Dinitrophenyl = DNP) in die DNA-Sonden einzubringen, gibt es verschiedene Methoden:

Nicktranslation

In dieser Arbeit wurden alle Maus-BACs, sowie die gesamengenomische DNA von Pferd und Esel mittels Nicktranslation markiert.

Das Prinzip der Nicktranslation beruht auf dem Zusammenspiel der beiden Enzyme Polymerase I und DNase I. Die DNase I spaltet die Phosphodiester-Bindungen der zugegebenen DNA-Probe, so dass Einzelstrangbrüche mit freiem 5'-Phosphat und 3'-OH-Gruppen (= nicks) entstehen. Die freien OH-Gruppen dienen als Ansatzpunkt für die Polymerase I. Sie besitzt als einzige Polymerase 5' → 3' Endonukleaseaktivität. Dadurch hydrolysiert das Enzym den alten Strang in 5' → 3' Richtung, während es gleichzeitig einen neuen Strang synthetisiert. Dabei dient der komplementäre Strang als Matrize. Die dem Reaktionsmix zugesetzten, markierten Nukleotide werden so in die Sonden-DNA eingebaut. Zusätzlich werden die eingesetzten DNA-Fragmente von der DNase I zerkleinert. Daher ist es wichtig, die Reaktion rechtzeitig zu stoppen, bevor die einzelnen Fragmente zu klein werden. Ideal sind Längen zwischen 200 und 500 bp. Dies wird nach jeder Nicktranslation durch eine Gelelektrophorese überprüft.

Nicktranslationsansatz (50 µl)		
Menge	Stoff	Endkonzentration
5 µl	10× NT-Puffer	0,5 M Tris-HCl; 50 mM MgCl ₂
5 µl	dNTP-Mix	50 µM ACG; 10 µM T
5 µl	0,1 M β-Mercaptoethanol	10 mM
1 µl	label-dUTP (Biotin, Digoxigenin oder DNP)	13 µM
x µl	DNA	1 µg
1 µl	Polymerase I	
1 µl	DNase I (1:250)	
add 50 µl	H ₂ O	
Σ = 50 µl		

- Das Ganze **70-90 min** im Wasserbad bei **15°C** verdauen lassen. Die genaue Zeit hängt von der Aktivität der DNase, den markierten Nukleotiden und der Sonden-DNA ab.
- Reaktion (vorläufig) stoppen, indem Proben auf Eis gestellt werden; 5 µl für Gellauf entnehmen
- Gel laufen lassen, um Fragmentlänge zu überprüfen; bei Bedarf Nachverdau ansetzen
- Reaktion endgültig mit **0,5 M EDTA** (2µl) stoppen

Label-DOP-PCR

Alle verwendeten Chromosomenpaints wurden mit sekundärer DOP-PCR amplifiziert (siehe 2.3.1) und anschließend die Hapten-gekoppelten dUTPs mittels Label-DOP-PCR eingebaut. Die Label-DOP-PCR entspricht im Wesentlichen der sekundären DOP-PCR. Der einzige Unterschied besteht in der verkürzten Extensionszeit. Dadurch werden kürzere Amplifikate mit einer Länge von 300-600 bp generiert, was der benötigten Größe für 3D-FISH Sonden entspricht. Die Label-DOP-PCR hat also neben der Markierung auch eine Verkürzung der DNA zur Folge. Im

Anschluss an jede DOP-PCR wird der Gehalt und die richtige Länge der DNA mittels Gelelektrophorese überprüft.

Universeller Mastermix für eine Label-DOP-PCR (500 µl)			
Menge	Stoff	Endkonzentration	
50 µl	10× PCR-Puffer	50 mM	
10 µl	25 mM MgCl ₂	0,5 mM (gesamt 2 mM)	
50 µl	6 MW-Primer	2 µM	
25 µl	je 2 mM dATP, dCTP, dGTP	je 100 µM	
40 µl	1 mM dTTP	80 µM	
10 µl	label-dUTP	20 µM	
315 µl	H ₂ O bidest		
Label-DOP-PCR Ansatz (50 µl)			
Menge	Stoff		
48,5 µl	Mastermix (siehe oben)		
1 µl	DNA aus sekundärer DOP-PCR		
0,5 µl	Taq-Polymerase		
PCR-Programm für Label-DOP-PCR			
Temperatur	PCR-Programm	Dauer	Zyklen
94°C	Startdenaturierung	3 min	1×
94°C	Denaturierung	1 min	20×
56°C	Anlagerung der Primer	1 min	
72°C	Verlängerung / Synthese	30 sec	
72°C	Finale Verlängerung	5 min	1×

2.3.3 Herstellung von Maus-C₀t1-DNA aus genomischer DNA

Die Verwendung bestimmter DNA-Sonden wie z.B. Chromosomenpaints verlangt eine effektive Unterdrückung von Kreuzhybridisierungen, da besonders repetitive Elemente (LINES, SINES, Zentromer- und Telomersequenzen) auf allen Chromosomen gleichermaßen vorkommen. Diese Bereiche müssen durch einen Überschuss von C₀t1-DNA im Hybridisierungsmix abgedeckt werden.

Als C₀t1-DNA wird die Fraktion doppelsträngiger DNA-Stücke bezeichnet, die man erhält, wenn man fragmentierte, gesamtgenomische DNA denaturiert und bei definierter Salzkonzentration und Temperatur (0,3 M NaCl und 65°C) so lange renaturieren lässt bis $C_0 \times t = 1$, also Konzentration zum Zeitpunkt 0 mal Zeit gleich 1 (Knippers 2001). DNA, die bis dahin nicht wieder doppelsträngig vorliegt, wird von der Nuclease S1 abgebaut. C₀t1-DNA besteht folglich aus hochrepetitiven Sequenzen der ursprünglichen DNA mit Fragmentlängen von 300-600 bp.

In dieser Arbeit wurde neben gekaufter (Invitrogen, Kat. Nr. 18440-016), auch selbsthergestellte Maus-C₀t1-DNA verwendet. Dafür wurde zunächst gesamtgenomische DNA aus Mäuselebergewebe gewonnen (Gewinnung genomischer DNA, siehe 2.3.1) und diese entsprechend weiterbehandelt.

Zerkleinerung der DNA

- Beispielmenge: 12 mg DNA in 5 ml TE-Puffer pH 8,0
- Zerkleinerung der DNA in 50 ml Röhrchen auf Eis durch fraktionierte Ultrabeschallung. Um 300-600 bp lange Fragmente zu erhalten, ist bei dem Modell W220F eine Einstellung zwischen 6 und 7 zu wählen. Die Spitze des Sonicators soll sich genau in der Mitte der DNA-Lösung befinden. Die Behandlung dauert 7×2 min mit jeweils 2 min Pause zum Abkühlen der Lösung.
- Überprüfung der Fragmentlängen auf einem 1% Agarosegel

Denaturierung und DNA-Abbau

- Aufschmelzen der DNA bei 96°C im Wasserbad für 6 min
- 4 min Äquilibration bei 65°C
- Zugabe von 300 µl 5 M NaCl auf Endkonzentration 0,3 M NaCl (Werte bezogen auf Beispiel mit 12 mg in 5 ml)
- Reassoziierung der DNA in 0,3 M NaCl bei 65°C für X sec (137 sec im Beispiel)
- Stopp der Reassoziierung durch Zugabe von 5,3 ml (5 ml + 300 µl) eiskaltem 2× Nuklease S1 Puffer
- Zugabe von 12,5 µl Nuklease S1 (5000 U) und 30 min Inkubation bei 37°C zur Eliminierung nicht reassoziierter, einzelsträngiger DNA
- 2 Vol EtOH (100%) zugeben und die DNA über Nacht auf -20°C (Ethanol-fällung) stellen
- 30 min bei 2300 g zentrifugieren
- Pellet 5 min in Vakuumzentrifuge trocknen
- C₀t1-DNA in 400 µl TE-Puffer aufnehmen
- Photometrische Messung der DNA-Konzentration (1-5 µg/µl)

2.3.4 Herstellung von Metaphasechromosomen-Präparaten (2D)

Von Maus-ES-Zellen (siehe 2.1.4) und Lymphozyten (siehe 2.1.9) aus Pferd, Esel und Maultier wurden Metaphasepräparate hergestellt, um die verschiedenen FISH-Sonden zu testen (Abb. 24). Im Fall von Mauszellen konnte überprüft werden, ob ein BAC auf dem richtigen Chromosom an der erwarteten Position hybridisiert. Erfahrungsgemäß werden ca. 10% der BACs falsch geliefert bzw. generiert und können nicht weiterverwendet werden. Ebenso wurde die Qualität der Paintsonden getestet und die Proben gegebenenfalls optimiert. Auf den 2D-Präparaten von Pferd, Esel und Maultier wurden das Funktionieren der FISH-Sonden der verschiedenen Spezies getestet. Besonders die Unterscheidbarkeit der Pferd- und Esel-Sonden auf Maultierpräparaten war von entscheidender Wichtigkeit. Des Weiteren konnte man die Chromosomen zählen und den Karyotyp auf die richtige Anzahl hin überprüfen.

Für die Herstellung der Chromosomenpräparate werden die Zellen in der Metaphase angereichert. Das geschieht durch Colcemid-Zugabe. Colcemid hemmt die Bildung des Spindelapparates und eine Zellteilung unterbleibt. Anschließend werden die Zellen mit hypotoner Salzlösung

behandelt und in Methanoleisessig gewaschen. Durch Wasseraufnahme quellen sie auf und zerplatzen beim späteren Auftropfen auf den Objektträger. Die Chromosomen fließen auseinander, weil die Kernhülle zur Mitose abgebaut wurde.

Material für die Präparation von Metaphasechromosomen	Hersteller
Colcemid (Stock: 10 µg/ml)	Biochrom, Berlin
Trypsin / EDTA (0,05% / 0,02%)	Biochrom, Berlin
Hypotonische Lösung: 0,56% KCl, 37°C	Merck, Darmstadt
Fixativ: Methanol/Eisessig (3:1), eiskalt	Merck, Darmstadt
Ethanol (70%, 90%, 100%)	BfB, München

- ES-Zellen (ohne Feederzellen) oder Lymphozyten in einer T75 hochziehen; Zellen sollen sich in der Wachstumsphase befinden und deshalb nicht vollständig konfluent sein
- einige Stunden vor Weiterbehandlung frisches Medium zugeben
- 0,2 µg/ml Colcemid zum Kulturmedium geben und für 1 h zurück in den Inkubator stellen
- Adhärenz Zellen trypsinieren
- Zellen in ein 15 ml Röhrchen überführen, bei 1000 rpm 5 min zentrifugieren
- Überstand bis auf 0,5 ml abnehmen und Pellet durch vorsichtiges Schnippen resuspendieren
- 10 ml KCl tropfenweise zugeben; 10 min bei RT
- zur Präfixierung 1 ml eiskaltes Fixativ tropfenweise zugeben und vorsichtig mischen (diesen Schritt nur bei Lymphozyten)
- 5 min bei 700 rpm zentrifugieren
- Überstand bis auf 0,5 ml abnehmen und Pellet vorsichtig, aber vollständig resuspendieren
- 2-3 ml eiskaltes Fixativ tropfenweise zugeben (Abzug!), dann bis zur 15 ml Marke mit Fixativ auffüllen
- mindestens 30 min auf -20°C
- 10 min bei 1000 rpm zentrifugieren
- Waschschrift mit Fixativ evtl. wiederholen
- Pellet in 2-3 ml Fixativ resuspendieren; Suspension bei -20°C aufbewahren oder zum Auftropfen auf Eis stellen

Anschließend werden die hypoton behandelten Zellen auf Objektträger im Wasserbad getropft (Deng 2003) und damit zum Platzen gebracht:

- Metallbox in 50°C Wasserbad stellen
- mit Ethanol gereinigte Objektträger in Metallbox legen und vorwärmen
- mit Pasteurpipette einen Tropfen Zellsuspension auf Objektträger tropfen
- Wasserbad zügig schließen
- nach ca. 1 min ist die Flüssigkeit verdampft und das Präparat kann entnommen werden

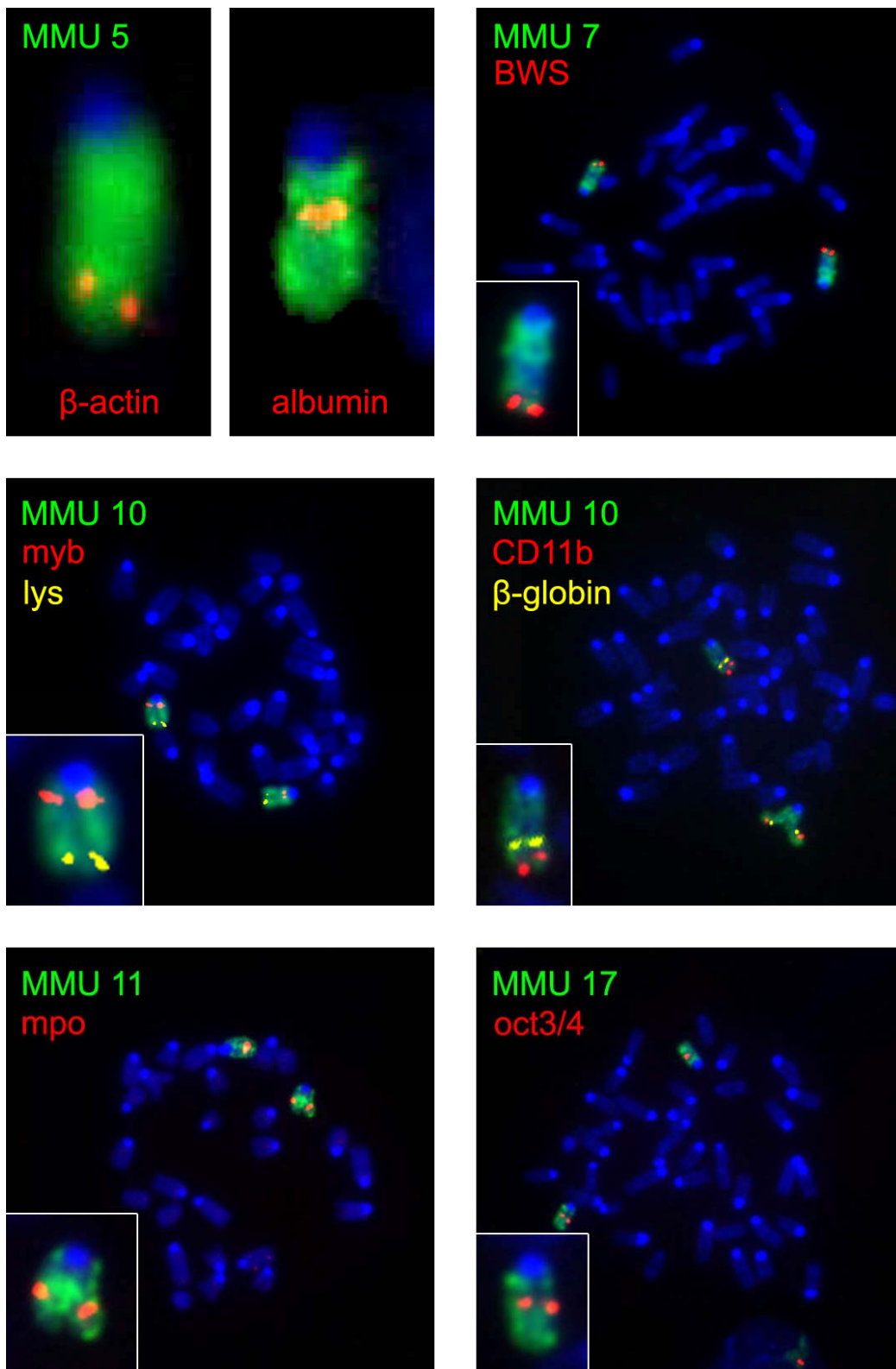


Abb. 24: Test der verwendeten Paint- und BAC-Sonden mittels 2D-FISH auf Metaphasespreitungen von ES-Zellen. Die Abbildung von Chromosom 5 wurde aus der Diplomarbeit von Alexander Mannes (2006) übernommen.

Die Metaphasespreitungen können sofort unter dem Phasenkontrastmikroskop kontrolliert werden. Evtl. muss erneut mit Fixativ gewaschen und/oder die Konzentration der Suspension geändert werden.

Für eine optimale Hybridisierung werden die Präparate mittels aufsteigender Ethanolreihe dehydriert (je 3 min in 70%, 90%, 100% EtOH) und bei 60°C im Trockenschrank für eine Stunde künstlich gealtert.

2.3.5 2D-Fixierung von Interphasekernen nach W. Bickmore

Um die Ergebnisse einer 2D- und 3D-Fixierung von Interphasekernen vergleichen zu können, wurden ES-Zellen nach einem Protokoll von W. Bickmore (Edinburgh, UK) fixiert.

Lösungen für die 2D-Fixierung von Interphasekernen nach W. Bickmore
Hypotonische Lösung [1 g Natriumcitrat (0,5%); 0,5 g KCl (0.25%) in 200 ml ddH ₂ O]
Methanoleisessig (3 :1), frisch angesetzt
RNase in 2×SSC (100 µg/ml)
EtOH (70%, 90%, 100%)
70% Formamid in 2×SSC (pH 7,5)

- Zellen in Kulturflasche trypsinieren, in Medium resuspendieren und abzentrifugieren
- Pellet in hypotoner Lösung resuspendieren und 10 min bei 37°C inkubieren
- Zellen vorsichtig abzentrifugieren und bei RT in Methanoleisessig resuspendieren
- 10 min bei RT
- Zellen abzentrifugieren und erneut in Methanoleisessig resuspendieren
- über Nacht auf 4°C stellen
- Zellen abzentrifugieren und in einigen ml Methanoleisessig resuspendieren
- Zellen auf Objektträger tropfen, dabei evtl. Konzentration der Lösung optimieren
- Präparate über Nacht bei RT trocknen lassen
- 1 h bei 37°C in 2×SSC mit RNase inkubieren
- 2× in SSC waschen
- Präparate in aufsteigender Ethanolreihe dehydrieren (je 2 min in 70%, 90% und 100% EtOH)
- 10 min in der Vakuumzentrifuge trocknen (Präparate zum Aufbewahren in eine geschlossene Box bei -20°C)
- Objektträger 5 min auf 70°C temperieren und in vorgewärmtem Formamid (70%) 2-3 min bei 70°C denaturieren
- zügig in eiskalten Ethanol (70%) stellen und erneute Ethanolreihe durchführen
- Trocknen der Präparate in der Vakuumzentrifuge; währenddessen Hybridisierungsmix 5 min bei 70°C denaturieren

2.3.6 Fixierung und Permeabilisierung von Zellen für 3D-FISH

Die Ziel-DNA liegt bei der 3D-FISH in Interphasekernen vor. Die Zellkerne sollen während der Fixierung bzw. Permeabilisierung ihre dreidimensionale Struktur so gut wie möglich behalten. Deshalb muss bei allen Schritten ein Austrocknen der Präparate verhindert werden (Solovei 2002).

Es wurden sowohl adhärenzte Zellen wie ES-Zellen, Makrophagen, Myoblasten (PMI28) und Fibroblasten, als auch in Suspension wachsende Lymphozyten fixiert. Lymphozyten müssen zunächst auf Poly-L-lysinieren Deckgläsern angeheftet werden (siehe 2.1.9). Myoblasten und Fibroblasten werden ebenfalls auf Poly-L-Lysin ausgesät. Lediglich Makrophagen wachsen auf der blanken Glasoberfläche. Bei ES-Zellen ist besondere Aufmerksamkeit nötig. Da die Stammzellen kugelige Kolonien bilden, ist es nötig, die Zellen vor dem Aussäen gründlich zu trypsinieren. Nach dem Ausbringen auf gelatinisierte Deckgläser (siehe 2.1.3), sollte die Fixierung der Zellen nach 1-2 Stunden und damit vor der erneuten Zusammenlagerung erfolgen. Allgemein ist eine maximal 50-prozentige Konfluenz der Zellen auf dem Deckglas vorteilhaft.

Lösungen für die 3D-Fixierung von Interphasezellkernen	
PBS + 0,05% Triton X-100	1000 ml PBS + 500 µl Triton X-100
PBS + 0,5% Triton X-100	1000 ml PBS + 1 ml Triton X-100
4% PFA in 1×PBS	4 g PFA-Pulver + 200 ml PBS, auf 60°C erhitzen und 10-15 min rühren, bis Lsg. klar
20% Glycerol in PBS	160 ml PBS + 40 ml Glycerol
0,1 M HCl	(20 ml 1 M HCl + 180 ml H ₂ O)
50% Formamid in 2×SSC	100 ml Formamid + 100 ml 2×SSC

- Kulturmedium abgießen und Deckgläser 1 min in vorgewärmtem PBS waschen (1×PBS für Makrophagen, Myoblasten und Fibroblasten; 0,75×PBS für ES-Zellen; 0,4×PBS für Lymphozyten)
- 10 min Fixierung in 4% PFA
- 3×5 min waschen in PBS + 0,05% Triton X-100
- 20 min bei RT in PBS + 0,5% Triton X-100
- mind. 30 min bei RT in 20% Glycerol, besser über Nacht
- Deckgläser kurz in flüssigen Stickstoff tauchen, bei RT auftauen lassen und zurück in Glycerol; diesen Schritt 4× wiederholen
- 3×5 min in 1×PBS waschen
- 5-10 min in 0,1 M HCl
- 2×1 min in 2×SSC
- mind. 30 min in 50% Formamid + 2×SSC, Lagerung über mehrere Wochen möglich

Diese Schritte permeabilisieren die Zellkerne und machen die Kern-DNA zugänglich für die Sonden und Antikörper der Detektion, ohne deren Struktur wesentlich zu verändern (Heppner 2007).

Im Anschluss an die Fixierung der Zellen wird evtl. ein Pepsinverdau durchgeführt. Besonders bei Zellen mit großer Menge an Cytoplasma, wie z.B. Makrophagen, kann das nötig sein. Dadurch wird die Zugänglichkeit des Zellkerns für Sonden und die spezifische Bindung der Antikörper verbessert (Lengauer 1992).

Material für die Pepsinierung von 3D-Präparaten für FISH	
50 mg/ml Pepsin in 1×PBS	
MgCl ₂ Lösung (190 ml 1×PBS + 10 ml 1 M MgCl ₂)	
1% PFA (1 g PFA in 100 ml 1×PBS)	

- 5 min äquilibrieren der Präparate in 1×PBS
- 2-10 min Pepsinbehandlung bei 37°C (Kontrolle am Phasenkontrastmikroskop)
- stoppen der Reaktion mit PBS/MgCl₂
- 5 min Nachfixierung des Präparats in 1% PFA

2.3.7 Herstellung der Hybridisierungsmixe

Im Fall der BAC- und Paint-Sonden für verschiedene Zelltypen wurden entsprechende Hybridisierungsmixe zusammengestellt (Tabelle 2). Diese enthielten jeweils ein oder zwei markierte BACs und den zugehörigen Chromosomenpaint (siehe 2.3.2). Der fertige Mix sollte pro Mikroliter 40-60 ng Paintsonde, ca. 20 ng jeder BAC-Sonde und 4 µg C₀t1-DNA enthalten. Dafür wurden die entsprechenden Mengen aller Sonden und der C₀t1-DNA (siehe 2.3.3) zusammenpipettiert und mit dem 2,5-fachen Volumen 100% Ethanol bei -20°C für 30 min gefällt. Anschließend wurde die DNA bei 13000 rpm für 30 min abzentrifugiert, der Überstand vorsichtig abgenommen und das Pellet in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Zur trockenen DNA wurde zuerst Formamid (50% des Endvolumens) gegeben und der Lösungsvorgang durch Schütteln bei 40°C beschleunigt. Erst dann wurde ein entsprechendes Volumen an Dextransulfat zugegeben und damit der Hybridisierungsmix komplettiert.

Material für die Herstellung eines Hybridisierungsmix	
markierte Chromosomen-DNA (~ 40-60 ng/µl)	Vakuumzentrifuge
Maus C ₀ t1-DNA (1 µg/µl)	deionisiertes Formamid (pH7), F-9037 Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Lachs-Testis-DNA (10 µg/µl), Gibco BRL, 15632-011	Hybridisierungs-Mastermix: 20% Dextransulfat (Amersham, Freiburg) in 2SS×C
100% Ethanol (Type 510)	beheizter Schüttler (40°C)

Hybmix	Markierung			Zelltyp
MMU5 Actin Albumin	MMU5-DNP	Act-Bio	Alb-Dig	ES-Zellen Makrophagen Myoblasten
	MMU5-Bio	Act-Dig	Alb-DNP	
MMU7 CD11b β -Globin	MMU7-DNP	CD11b-Dig	Glob-Bio	ES-Zellen Makrophagen
MMU10 Myb Lysozym	MMU10-DNP	Myb-Dig	Lys-Bio	ES-Zellen Makrophagen
MMU7 BWS-Region	MMU7-DNP	BWS-Dig		ES-Zellen (2D + 3D Präparate)
MMU11 Mpo	MMU11-DNP	Mpo-Dig		ES-Zellen Makrophagen
MMU17 Oct3/4	MMU17-DNP	Oct3-Dig		ES-Zellen diff. ES-Zellen Makrophagen

Tabelle 2: Übersicht der Hybridisierungsmixe (Chromosomenpaints und Genloci) und Markierungsschemata für verschiedene Mauszelltypen. Alle Haptene wurden mittels zwei aufeinanderfolgender Antikörper nachgewiesen (siehe 2.3.9, Tabelle 4).

Für Esel, Pferd und Maultier wurden gesamtgenomische Sonden verwendet (siehe 2.3.1). Mittels Nicktranslation wurden diese für jede Spezies in zwei getrennten Ansätzen mit Dig und Bio markiert (Tabelle 3). Pro Mikroliter Hybridisierungsmix sollten 40 ng DNA jeder Spezies enthalten sein. Um die Sonden zu testen, wurden Hybridisierungsmixe mit gleichem Anteil an Pferd- und Esel-Sonden in unterschiedlicher Markierung hergestellt und auf 2D-Präparaten von Esel, Pferd und Maultier getestet. Dabei sollten möglichst keine Kreuzhybridisierungen stattfinden. Da sich die beiden Spezies aufgrund des geringeren Selektionsdrucks v.a. in ihren genarmen, repetitiven Sequenzen (Satelliten) im Bereich des Zentromers unterscheiden, wurden die Hybridisierungsbedingungen so gewählt, dass diese Bereiche bevorzugt Sonden binden. Dies erfolgte unter anderem mittels einer kurzen Hybridisierungszeit (siehe 2.3.8). Die maternalen und paternalen Chromosomen des Maultiers sollten nach der Detektion deutlich zu erkennen bzw. unterscheidbar sein. Erst wenn Hybridisierungsmix und -bedingungen ausreichend getestet waren, wurde der Versuch auf 3D-Präparaten wiederholt.

Ausgangsmaterial	Hyb.mix		Detektion	FISH
gesamtgenomische Esel-DNA gesamtgenomische Pferd-DNA	1	Pferd-Dig	Biotin: Avidin Alexa 488 Digoxigenin: Maus- α -Dig-Cy3	auf: • Metaphasen von Esel, Pferd und Maultier • 2D- und 3D-Maultier- Interphasekernen fixier- ter Fibroblasten und Lymphozyten
		Esel-Bio		
	2	Esel-Dig		
		Pferd-Bio		

Tabelle 3: Reziproke Sondenmarkierung von Pferd- und Esel-DNA für FISH auf Metaphasespreitungen und Interphasekernen von Pferd, Esel und/oder Maultier.

2.3.8 Hybridisierung auf 2D- und 3D-Präparate

Das Hybridisieren aller Sonden auf Metaphasechromosomen dient der Kontrolle von Signalen und Hybridisierungsbedingungen. Dazu wird bei 2D-Präparaten am Phasenkontrastmikroskop ein Areal mit möglichst vielen Metaphasen ausgewählt und mit einem Diamantstift markiert. Für eine 3D-FISH wird ein Deckglas mit den entsprechend fixierten Zellen (siehe 2.3.6.) verwendet, das bis zum Ansatz der Hybridisierung in 50% Formamid / 2×SSC bleibt. Ein Austrocknen des Präparats muss während des gesamten Vorgangs unbedingt vermieden werden, da die 3D-Struktur der Interphasekerne ansonsten verloren geht. Manchmal wird 2D- und 3D-FISH in einem Ansatz kombiniert, indem man den Hybridisierungsmix zwischen Metaphase- und Interphase-Präparat gibt. Damit erhält man gleiche Bedingungen für beide Experimente und spart zugleich Zeit.

- Der Hybridisierungsmix wird für 5 min bei 80°C im Wasserbad denaturiert.
- Für eine 2D-FISH werden 3 μ l des Hybridisierungsmixes auf das ausgewählte Areal pipettiert und mit einem kleinen Deckglas (12×12 mm) abgedeckt.
- Bei einer 3D-FISH werden ca. 5 μ l Hybridisierungsmix auf einen Objektträger gegeben. Das Deckglas mit den Zellen (10×10 mm) wird mit einer Pinzette herausgenommen und auf einem Papiertuch abgetropft. Anschließend wird es mit den Zellen nach unten auf den Objektträger gelegt.
- Die Deckgläser werden mit Fixogum abgedichtet und nach dem Trocknen auf einem 75°C Heizblock 2-3 min denaturiert.
- Die eigentliche Hybridisierung findet bei 37°C in einer Metallbox im Wasserbad statt. Die Dauer beträgt für 2D-Präparate mindestens einen Tag und für 3D-Präparate mindestens zwei Tage. Gesamtgenomische Sonden von Esel und Pferd hybridisiert man auch auf Interphasekerne nicht länger als einen Tag, um verstärkte Kreuzhybridisierungen zu vermeiden.

2.3.9 Detektion der FISH-Signale

In dieser Arbeit wurden 2D- und 3D-FISH-Signale eines Experiments auf identische Art und Weise mit den jeweils gleichen Antikörpern nachgewiesen (Tabelle 4).

Material für FISH-Detektion	Hersteller
Blocklösung (4% BSA in 4×SSC), Bovines Serumalbumin Fraktion V (BSA)	ICN Biomedicals, Eschwege
Kaninchen-α-DNP	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Ziege-α-Kaninchen-Cy3	Amersham-Pharmacia Biot., Braunschweig
Avidin Alexa488	Molecular Probes, Eugene, OR
Ziege-α-Kaninchen-Alexa488	Molecular Probes, Eugene, OR
Ziege-α-Avidin-FITC	Vector Laboratories, Burlingame, CA
Ziege-α-Streptavidin-Bio	Vector Laboratories, Burlingame, CA
Maus-α-Dig-Cy5	Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA
Maus-α-Dig-Cy3	Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA
Ziege-α-Maus-Cy5	Dianova, Hamburg
Schaf-α-Maus-Cy3	Dianova, Hamburg
Streptavidin-Cy5	FMC Rockland, ME
DAPI (5 µg/ml)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
TO-PRO-3 (1 mM)	Molecular Probes, Leiden
Vectashield	Vector Laboratories, Burlingame, CA
0,1×SSC; 2×SSC; 4×SSC	

Gesamtgenomische Sonden von Pferd und Esel		
Hapten	1. Antikörper	2. Antikörper
Bio	Avidin-Alexa488	-
Dig	Maus-α-Dig-Cy3	-
Genloci und Chromosomenpaints I (alle außer β-Actin, Albumin und MMU5)		
Hapten	1. Antikörper	2. Antikörper
Bio	Streptavidin-Cy5	Ziege-α-Streptavidin-Bio
Dig	Maus-α-Dig-Cy3	Schaf-α-Maus-Cy3
DNP	Kaninchen-α-DNP	Ziege-α-Kaninchen-Alexa488
Genloci und Chromosomenpaints II (nur β-Actin, Albumin und MMU5)		
Hapten	1. Antikörper	2. Antikörper
Bio	Avidin-Alexa488	Ziege-α-Avidin-FITC
Dig	Maus-α-Dig-Cy5	Ziege-α-Maus-Cy5
DNP	Kaninchen-α-DNP	Ziege-α-Kaninchen-Cy3

Tabelle 4: Verwendete Antikörperlkombinationen zum Nachweis der drei verwendeten Haptene in den verschiedenen FISH-Experimenten.

Die ersten, unstringenten Waschschrte dienen der Entfernung des überschüssigen Hybridisierungsmixes. Das folgende stringente Waschen entfernt unspezifische Bindungen der Sonden-DNA. Unspezifische Bindungsstellen auf dem Präparat werden mit BSA geblockt. Bei 2D-Präparaten (Objektträger) verwendet man für diese Schritte 50 ml Küvetten und für 3D-Präparate (Deckgläser) 6Well-Platten. Die mittels DNP, Biotin oder Digoxigenin indirekt markierten Sonden werden mit zwei Schichten Fluorochrom-gekoppelter Antikörper nachgewiesen. Alle Antikörperinkubationen und darauf folgende Waschschrte sollten unter Lichtabschluss durchgeführt werden, um ein Ausbleichen der Fluorochrome zu verhindern.

- Fixogum abziehen, Deckglas und Objektträger vorsichtig voneinander lösen
- 3×5 min bei 37°C in 2×SSC waschen, dabei schütteln
- 3×5 min bei 60°C in 0,1×SSC waschen, dabei schütteln
- kurz in 4×SSC equilibrieren
- 20 min bei 37°C in SSCT + 4% BSA blocken, dabei schütteln
- Antikörper/Avidin in Blocklösung auf ein Gesamtvolumen von ca. 500 µl verdünnen und AK-Lösung (erster Layer) auf den Objektträger / das Deckglas pipettieren, mit Parafilm abdecken und 40 min bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubieren.
- 3×5 min in 4×SSC waschen, dabei schütteln
- Zweiten AK (zweiter Layer) auftragen und ebenfalls 40 min bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubieren
- 3×5 min in 4×SSC waschen, dabei schütteln

Nach der Detektion der FISH-Signale erfolgt evtl. ein Nachweis von Splicing Speckles (siehe 2.3.11). Die Präparate werden anschließend mit TO-PRO-3 oder DAPI gegengefärbt. Dazu werden die in PBS gewaschenen, feuchten Deckgläser, oder die mit ddH₂O gewaschenen und getrockneten Objektträger, für 5 min mit Färbelösung überschichtet und mit Parafilm abgedeckt. Das Ganze geschieht bei RT in einer Box mit Deckel, um ein Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe zu verhindern.

Zuletzt werden die Präparate mit einem Tropfen Antifade-Medium versehen und mit einem Objektträger / Deckglas und Nagellack versiegelt. Die Präparate sind nun fertig zum Mikroskopieren. Aufbewahrung erfolgt im Dunklen bei 4°C.

2.3.10 Kombination von FISH mit BrdU-Nachweis oder Immunofluoreszenz

BrdU-Nachweis

Um die Teilungsunfähigkeit vollständig ausdifferenzierter Makrophagen zu zeigen (siehe 2.1.8, Abb. 12) oder ES-Zellen in der S-Phase zu synchronisieren (siehe Abb. 44) kann ein BrdU-Nachweis durchgeführt werden. Dieser wurde im Fall der ES-Zellen mit einer FISH kombiniert und gemeinsam detektiert. Dazu werden nach der Fixierung und Denaturierung der Zellen die FISH-Signale detektiert (siehe 2.3.9), anschließend umgepuffert und der Antikörpernachweis von BrdU durchgeführt (Protokoll siehe 2.1.8).

Immunofluoreszenz mit anschließender FISH

Die Identifikation von undifferenzierten ES-Zellen und in vitro differenzierten Makrophagen erfolgt u.a. über den Nachweis der Oberflächenantigene Oct3/4 (siehe 2.1.5) und CD11b (siehe 2.1.8).

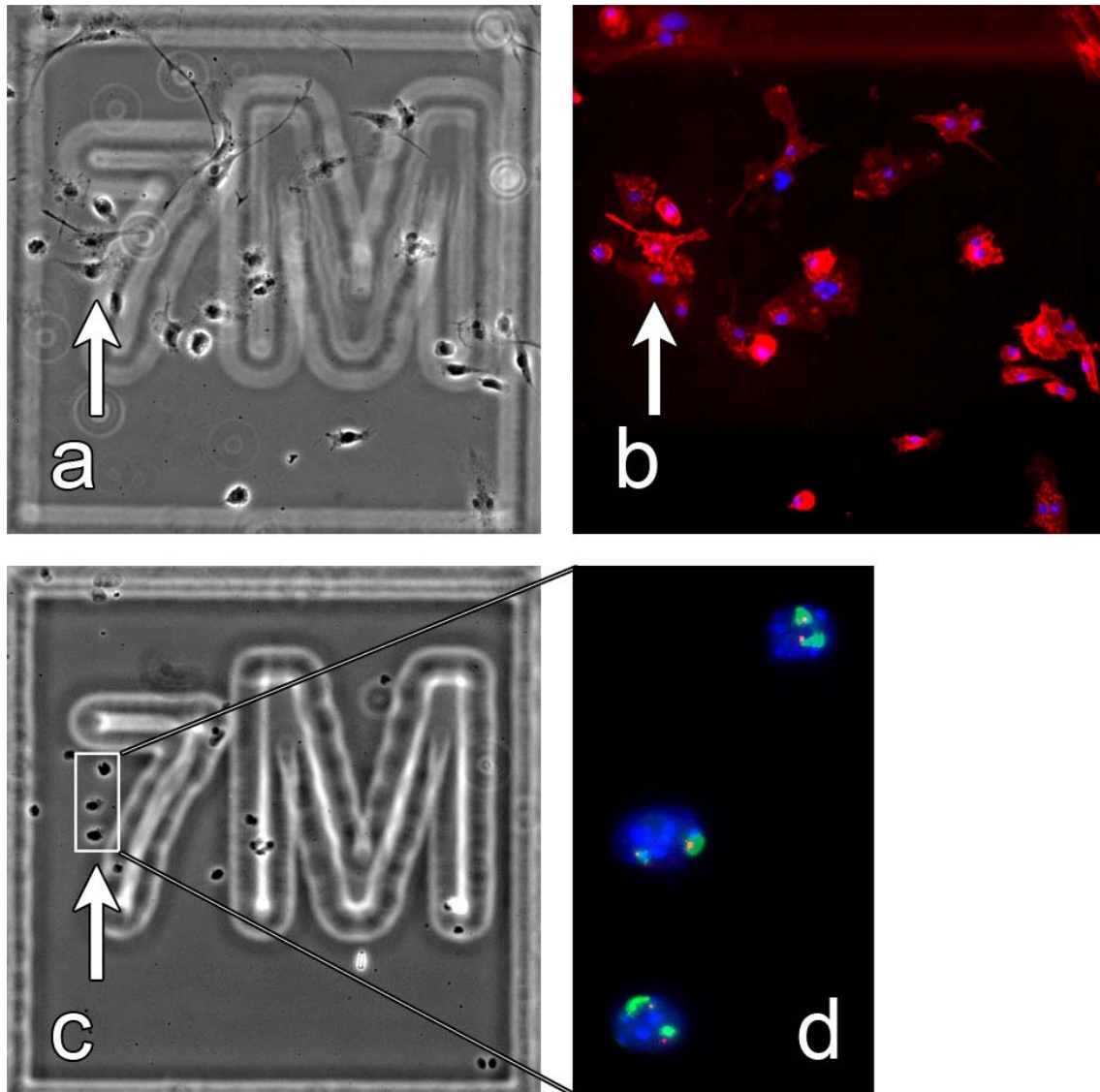


Abb. 25: Kombination von Immunofluoreszenzfärbung und FISH am Beispiel von in vitro differenzierten Makrophagen der Maus. a) Transmissionsaufnahme der ausgesäten Zellen auf einem Grid direkt nach der Fixierung. b) CD11b-Färbung der Zellen aus a in rot und DAPI-Gegenfärbung in blau. Fast alle Zellen exprimieren CD11b und besitzen die für Makrophagen typische Morphologie. c) Transmissionsbild desselben Ausschnitts nach 3D-FISH. Viele Zellen haben sich durch die damit verbundenen Denaturierungs- und Detektionsschritte abgelöst. Das Cytoplasma der Zellen wurde verdaut. d) Drei Zellkerne aus c nach der Aufnahme am Fluoreszenzmikroskop. DAPI ist blau, ein Chromosomenpaint grün und ein zugehöriger BAC rot dargestellt.

Diese Antikörperfärbungen sind nach einer FISH, durch die erfolgte Denaturierung und das damit verbundene Erhitzen der Präparate, nicht mehr detektierbar. Um dennoch ausschließlich die gewünschten Zellen mit entsprechender Antigenexpression aufzunehmen und auszuwerten, werden Deckgläser mit einem eingetätzten Koordinatensystem verwendet (Etched Grid Coverslips, Bellco Biotechnology, USA). Anhand dieser sogenannten Grids kann man einzelne Zellen zweifelsfrei wiederfinden (Abb. 25a-d). Man sät die entsprechenden Zellen darauf aus und führt gleich nach der Fixierung eine Immunofluoreszenzfärbung durch, welche in Form von mikroskopischen Aufnahmen festgehalten wird (Abb. 25b). Erst anschließend folgt die 3D-FISH in Form von Permeabilisierung (siehe 2.3.6), Hybridisierung (siehe 2.3.8) und Detektion der Signale (siehe 2.3.9). Mit dem Laser-Scanning-Mikroskop (siehe 2.5.4) werden schließlich nur die FISH-Signale derjenigen Zellen aufgenommen, welche zuvor die entsprechende Immunofluoreszenz zeigten (Abb. 25d).

2.3.11 Antikörpernachweis von Splicing Speckles

In Makrophagen, ES-Zellen und differenzierten ES-Zellen wurden in Kombination mit einer 3D-FISH (Oct3/4 und MMU17) Splicing Speckles nachgewiesen. Der von D. Spector (Cold Spring Harbor, New York) für Mauszellen empfohlene Maus- α -SF2/ASF Antikörper kann mit einem sekundären α -Maus Antikörper nachgewiesen werden.

Material für den Antikörpernachweis von Splicing Speckles		
Maus- α -SF2/ASF (primärer Antikörper)	1:500	Zymed Laboratories, CA, cat # 32-4600
Ziege- α -Maus-Cy5 (Beispiel für sekundären Antikörper)	1:100	Dianova, Hamburg
Blocklösung Bovines Serumalbumin Fraktion V	4% BSA in 1×PBS	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Der Nachweis von Speckles erfolgt direkt nach der Detektion der FISH-Signale und noch vor der Gegenfärbung. Dazu wird das Präparat zunächst von SSC in PBS umgepuffert. Es folgt ein 15-minütiger Blockschritt in 4% BSA / 1×PBS. Die Inkubation mit SF2/ASF findet 45 min in einer feuchten Kammer statt. Die Vorgehensweise entspricht der Detektion der FISH-Signale. Nach 3×5 min Waschen in 1×PBS erfolgt die Inkubation des sekundären, Fluorochromgekoppelten Antikörpers (Ziege- α -Maus-Cy5). Danach wird eine Gegenfärbung durchgeführt und das Präparat eingedeckelt (siehe 2.3.9). Zur Kontrolle wird der Nachweis von Speckles auch ohne vorhergehende FISH, direkt nach der Fixierung der Zellen und dem Waschen in Triton X-100, durchgeführt. Damit wird gezeigt, dass es sich bei den Signalen um keine Artefakte aufgrund der Permeabilisierung oder Denaturierung handelt.

2.4 RT (Reverse Transkriptase) - PCR

Bei der RT-PCR werden Zellen auf Expression bestimmter Gene geprüft. Es handelt sich dabei um einen semiquantitativen Ansatz. Dazu isoliert man zunächst die gesamte RNA einer Zellpopulation und schreibt speziell die mRNA mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in cDNA um, indem ein oligo-dT-Primer an den Poly-A-Schwanz der mRNA bindet. Das in diesem Fall verwendete SuperscriptTM ist eine Abwandlung der MMLV (Moloney Murine Leukemia Virus) - RT mit erhöhter Hitzestabilität. Nach der reversen Transkription werden alle im Ansatz vorhandenen cDNA/mRNA Hybride mit Hilfe von RNase H verdaut, so dass nur noch die Erststrang-cDNAs vorliegen. Diese cDNA dient als Template für eine genspezifische PCR mit

speziell generierten Primerpaaren. Ist der entsprechende cDNA-Abschnitt vorhanden, so wird dieser relativ zu seiner Ausgangsmenge amplifiziert. Auf einem Agarosegel können die Amplifikatmengen und damit die Expressionsstärken der zu untersuchenden Gene miteinander verglichen und abgeschätzt werden. Ist kein Amplifikat zu erkennen, so handelt es sich um ein nicht-exprimiertes Gen.

In dieser Arbeit wurden mittels RT-PCR auch benachbarte Gene auf und neben den Maus-BACs, welche als FISH-Sonden verwendet wurden, bezüglich ihrer Expression in ES-Zellen untersucht. Alle verwendeten BAC-Sequenzen enthalten mehrere Gene, deren Aktivität abhängig vom Zelltyp sehr unterschiedlich sein kann. Beispielsweise kann ein inaktives Gen in der Nähe eines stark exprimierten Haushaltsgens liegen, dessen Anwesenheit die Position des gesamten DNA-Abschnitts und damit des FISH-Signals beeinflusst. Deshalb muss die Nachbarschaft eines bestimmten Genlocus mitberücksichtigt werden. Datenbanken liefern bezüglich der Expression in verschiedenen ES-Linien sehr unterschiedliche Ergebnisse.

Alle folgenden Arbeitsschritte werden in einem RNA-Raum durchgeführt, um Kontaminationen mit DNA zu vermeiden.

2.4.1 RNA-Isolation

Zunächst wird die gesamte RNA aus Zellen in Kultur isoliert.

Material für die Isolation von RNA	
peqGold Reagenz	Kat.: 30-1010; peqLab, Erlangen
RNase-freie Röhrchen	Biopur, Eppendorf
pro Ansatz eine 6 cm Petrischale mit subkonfluent gewachsenen Zellen	
Chloroform (CHCl ₃), Isopropanol, 70% Ethanol in DEPC-H ₂ O	

- Zellen für RNA-Isolation in 6 cm Petrischalen zwei Tage subkonfluent wachsen lassen, parallel dazu Zellen der gleichen Charge für 3D-FISH aussäen.
- Zellen in ca. 2 ml peqGold pro Schale aufnehmen, mit Pipette auf- und abziehen, bis die Zellen aufgelöst und die Lösung nicht mehr viskös ist.
- Je 1 ml Lösung in ein RNase-freies Eppendorf-Tube füllen; Aufbewahrung bei -80°C möglich.
- Pro Tube 200 µl Chloroform zugeben, mischen, 3 min bei RT.
- 15 min bei 4°C und 12000 rpm zentrifugieren. Ergebnis sind drei Phasen: Unten rosa Trizol-schicht, darüber weiße Proteinschicht und klarer Überstand.
- Überstand abnehmen (ca. 500 µl) und ohne Protein in frisches Eppendorf-Tube überführen.
- 500 µl (gleiches Volumen) Isopropanol zugeben und über Kopf schütteln, 10 min bei RT.
- 15 min mit 12000 rpm abzentrifugieren (Pellet kaum sichtbar) und Überstand verwerfen.
- 1 ml 70% EtOH zugeben
- 15 min bei 12000 rpm zentrifugieren (Pellet sollte jetzt sichtbar sein) und EtOH abnehmen.
- Pellet lufttrocknen lassen und in 10-30 µl DECP-H₂O resuspendieren.
- RNA kann bei -80°C aufbewahrt werden.

2.4.2 Photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration

Für die Messung der Konzentration benötigt man isolierte RNA in TE-Puffer mit einer Verdünnung von 1:500 oder 1:250. Die Absorption der RNA-Probe wird mit dem Photometer bei 260 nm und 280 nm gemessen. Das Verhältnis 260/280 gibt die Reinheit der isolierten RNA bezüglich Proteinen an. Die RNA-Konzentration wird mit folgender Formel berechnet:

$40 (\text{Abs. 260 nm}) \times \text{Verdünnungsfaktor (z.B. 500)} \times \text{OD} / 1000 = x \text{ } \mu\text{g}/\mu\text{l}$.

2.4.3 Kontrolle der RNA-Isolation mittels Gelelektrophorese

Mittels Gelelektrophorese wird die erfolgreiche RNA-Isolation überprüft.

Material für den RNA-Nachweis mittels Gelelektrophorese
RNase-freie Agarose (Endkonzentration 1,2%)
DEPC-H ₂ O
10× und 1×MOPS-Puffer
37% Formaldehyd und Formamid
1 μg isolierte RNA (ca. 2 μl)
Ethidiumbromid

- 0,6 g Agarose in 43,5 ml DEPC-H₂O lösen (Heizplatte) und auf 60°C temperieren
- 5 ml 10×MOPS zugeben und 1,5 ml 37% Formaldehyd zugeben
- Gel gießen (nicht zu lange trocken stehen lassen, da es reißen könnte und auch nicht länger in 1×MOPS-Puffer lagern, da sich das FA auswäscht)
- ca. 2 μl RNA + 1 μl 10×MOPS + 1,7 μl Formaldehyd + 5 μl Formamid + 1 μl EtBr
- 15 min bei 65°C inkubieren, 1 min auf Eis abkühlen und anschließend kurz abzentrifugieren
- 1 μl Ladepuffer zugeben und Gel beladen
- Gel in 1×MOPS-Puffer bei 100 V und 45 mA ca. 1 h laufen lassen, pH-Wert immer wieder überprüfen und Puffer zwischen den Kammern alle 20 min austauschen, um die Bildung eines pH-Gradienten zu verhindern. Ergebnis: Zwei, im besten Fall drei getrennte Banden, bestehend aus rRNA und tRNA (Abb. 26).

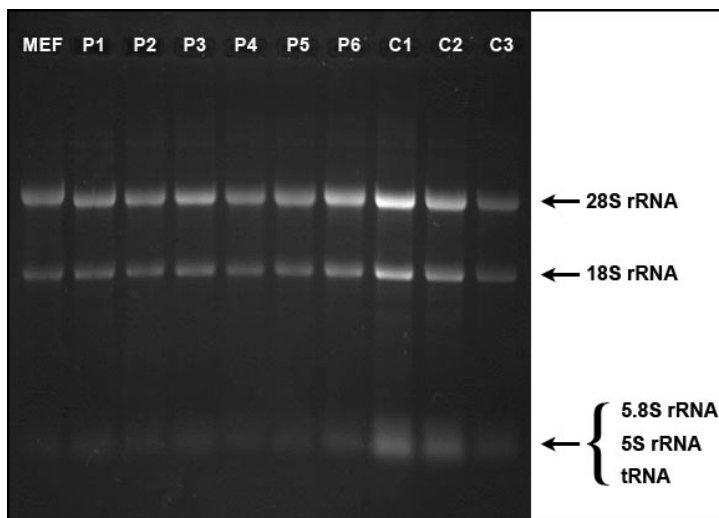


Abb. 26:
Beispiele isolierter RNA aus MEF (mouse embryonic fibroblasts), Myoblasten der Linie PMI28 (P1-P6) und ES-Zellen der Linie CCE (C1-C3) nach der Gelelektrophorese. Jede Spur zeigt einen einzelnen, unabhängigen Isolationsansatz. Zu sehen sind die drei typischen RNA-Banden, bestehend aus verschiedenen rRNAs und tRNA. Die mRNA und hn (heteronuclear) RNA sind normalerweise nicht zu erkennen.

2.4.4 Erststrang-cDNA Synthese

Die aus Zellen isolierte RNA wird mittels Erststrang-cDNA Synthese in einzelsträngige DNA umgewandelt.

Erststrang-cDNA Synthese		
Menge	Stoff	Konzentration
5 µg	isolierte RNA	
1 µl	Oligo16-(dT)-Primer	0,5 ng/µl
1 µl	dNTP	je 10 mM
4 µl	Erststrang-Puffer (FS-Buffer, Invitrogen)	5×
2 µl	DTT	0,1 M
1 µl	RNase Inhibitor (RNaseOut™)	40 U/µl
1 µl	Superscript™ II Reverse Transkriptase (Invitrogen)	200 U/µl
1 µl	RNase H	2 U/µl

- 10 µl RNA (5 µg) + 1 µl Oligo-dT-Primer + 1 µl dNTP (10 mM)
- 5 min bei 65°C inkubieren
- 2 min auf Eis kühlen, abzentrifugieren
- 4 µl 5× Erststrang-Puffer + 2 µl DTT + 1 µl RNase Inhibitor zugeben
- 2 min bei 42°C inkubieren
- 1 µl Reverse Transkriptase zugeben und 50 min bei 42°C inkubieren
- Reaktion durch 15 min Inkubation bei 70°C stoppen
- 1 µl RNase H zugeben und 20 min bei 37°C inkubieren

2.4.5 Primerdesign

PRIMER	forward	reverse	c-DNA	DNA
Hbb-b1	5'-ACT GTG ACA AGC TTC ATG TG-3'	5'-TCA TAG ACA CAT GGG ATT GC-3'	277	931
Hbb-bh1	5'-TGA ATC ACT TGG ACA GCC TC-3'	5'-ACA GAT GCT CTC TTG GGA AC-3'	206	1016
Hbb-y	5'-TCA GTG AAC TGC ACT GTG AC-3'	5'-GAC ACA CAG GAT TGC TGG AC-3'	214	959
Yeats4 (gas41)	5'-TCG CCA GCT GAC ATT GGG AGC CT-3'	5'-TCC CAG AAA CAC CGC AGC GTC TG-3'	287	1662
9530003J23 Rik	5'-AGT ACA TTC GGG GCT GCC ATC-3'	5'-TGC TTC AGG GCT GCT CAT AGG-3'	419	2094
Lyzs+Lzp-s	5'-CTG CAG GAT GAC ATC ACT GC-3'	5'-AGG CTG TTC TAA CTG GGT GC-3'	567 +568	1022 +1037
Cpsf6	5'-GTA GAG ATC GCC ACG ATG AC-3'	5'-TAT CCA TGA AGC CTT ACA GG-3'	235	6702
Fus	5'-CTA TGG AGA TGA TCG ACG TG-3'	5'-AAT ATC CAT GAG CGA TCC TG-3'	268	503
Pycard	5'-TGT GGC AGC TGC AGC CAG TGT C-3'	5'-TGG CTG TTC TGG AAC AGC CTC C-3'	710	859
Itgam (CD11b)	5'-ACC ACT CAT TGT GGG CAG CTC-3'	5'-TGT CCA TCA GCT TCG GTG TTG G-3'	220	679
Cox6a2	5'-TGC ACG CTG GCC ACC ACG AG-3'	5'-TGC TGG CAG AGC GTG TCT GC-3'	176	263
Ahi1	5'-TGG TCC GCA AAG TCA CCC TG-3'	5'-ATG ACG GCC TAC GGC ACA GC-3'	419	5025
Myb	5'-ACC GTA CCT AAG AAC AGG CCC CTG-3'	5'-TCC ACG CTG AGG CAT GTG TCG A-3'	231	13234
Actb (β-Actin)	5'-GGT ATG GAA TCC TGT GGA TC-3'	5'-CGC AGC TCA GTA ACA CTC CGC CT-3'	348	473
Pou5f1 (Oct3/4)	5'-TCA CAT CGC CAA TCA GCT TGG-3'	5'-AGG CTC CTG ATC AAC AGC ATC-3'	459	611
Tcf19	5'-AGG ACT TTG CAG CCA TAA CC-3'	5'-TAT TGT GGC AGA GCA CTT GC-3'	670	1960
Vars2l	5'-CTG TTG AAC CGG ACC ATG TG-3'	5'-TGA GGA AGG TGG TCC ATG TC-3'	235	628
Gtf2h4	5'-ACA GAC CAG ATT CGG CTG TG-3'	5'-ACA TCT GAG TTG GAA AGC TGC-3'	274	699
Nap1l4	5'-TGC TGA TGT TAA CCC CAA GG-3'	5'-ACA TGT AGT CTG CAT GGC AC-3'	749	6491
Cars	5'-TGA AGA TAC CAC CCA GTG AG-3'	5'-TCT TAC AAG CCA GTG GTT CTG-3'	752	1873
Osbp15	5'-TGC TAC AAG AGG CCG TGC TGT C-3'	5'-AGC CTG TCC ATG CTT GTG TGA GC-3'	702	2632
Alb1 (Al- bumin)	5'-CGG CTC TTG CTG AGC TGG TG-3'	5'-TGT TTA GGC TAA GGC GTC TTT GC-3'	179	748
Afp (α-fetoprot.)	5'-GCC TGA ACT GAC AGA GGA GCA GC-3'	5'-AGT TAA GCC AAA AGG CTC ACA CC-3'	219	950
Rassf6	5'-GCT AAA GAA GAC CGA TGT CCC A-3'	5'-CCC TCT AAC TCC GCT GAG CAG-3'	309	508

Tabelle 5: Für die RT-PCR verwendete Primer und die erwarteten Bandenlängen der cDNA bzw. mRNA, sowie der genomischen DNA. Die linke Spalte beinhaltet die Namen der Gene, wie sie auch in der Ensembl Datenbank verwendet werden. Siehe Abb. 22 bezüglich genomischer Nachbarschaften und Abb. 47 für die RT-PCR Ergebnisse.

Alle für die RT-PCR verwendeten Primer (Tabelle 5) stammen von MWG-Biotech (Ebersberg). Um passende Primer zu konstruieren, wurden Exonsequenzen aus www.ensembl.org kopiert. Mit der Software *FastPCR* (<http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/Programs/fastpcr.htm>) wurden Primer mit einer Länge zwischen 20 und 25 Nukleotiden und einer Schmelztemperatur zwischen 55°C und 66°C zusammengestellt. Der sogenannte Forward-Primer liegt im vorletzten Exon des zu untersuchenden Gens, während sich der Reverse-Primer in der 3'UTR befindet, was zu einer Amplifikatlänge von 200 bis 800 bp führt (Sequenzen der cDNA-Amplifikate siehe beigelegte CD). Die zwischen den beiden letzten Exons positionierten Introns der ursprünglichen Sequenz haben dabei eine ausreichende Länge, um Verunreinigungen mit genomischer DNA und dementsprechend längere Banden auf dem Gel erkennen zu können. Aus den von der Software vorgeschlagenen Primern wurden Paare mit ähnlichen Eigenschaften bezüglich Länge, GC-Gehalt und damit Schmelztemperatur zusammengestellt.

Die in der RT-PCR verwendeten Primerpaare wurden zunächst auf der entsprechenden BAC-DNA getestet (Abb. 27). Damit wurde, neben der optischen Signalkontrolle von BAC-Sonden auf Metaphasen (siehe Abb. 24), die DNA-Sequenz der BACs bestätigt. Dies war natürlich nur möglich, wenn das entsprechende Gen (vollständig) auf dem BAC lag. Dafür musste BAC-DNA isoliert (siehe 2.3.1) und mit den entsprechenden Primern eine PCR durchgeführt werden. Dabei wurden Ansätze mit ähnlicher Schmelztemperatur zusammengefasst und parallel amplifiziert. Das PCR-Programm entsprach dem einer RT-PCR (siehe 2.4.6).

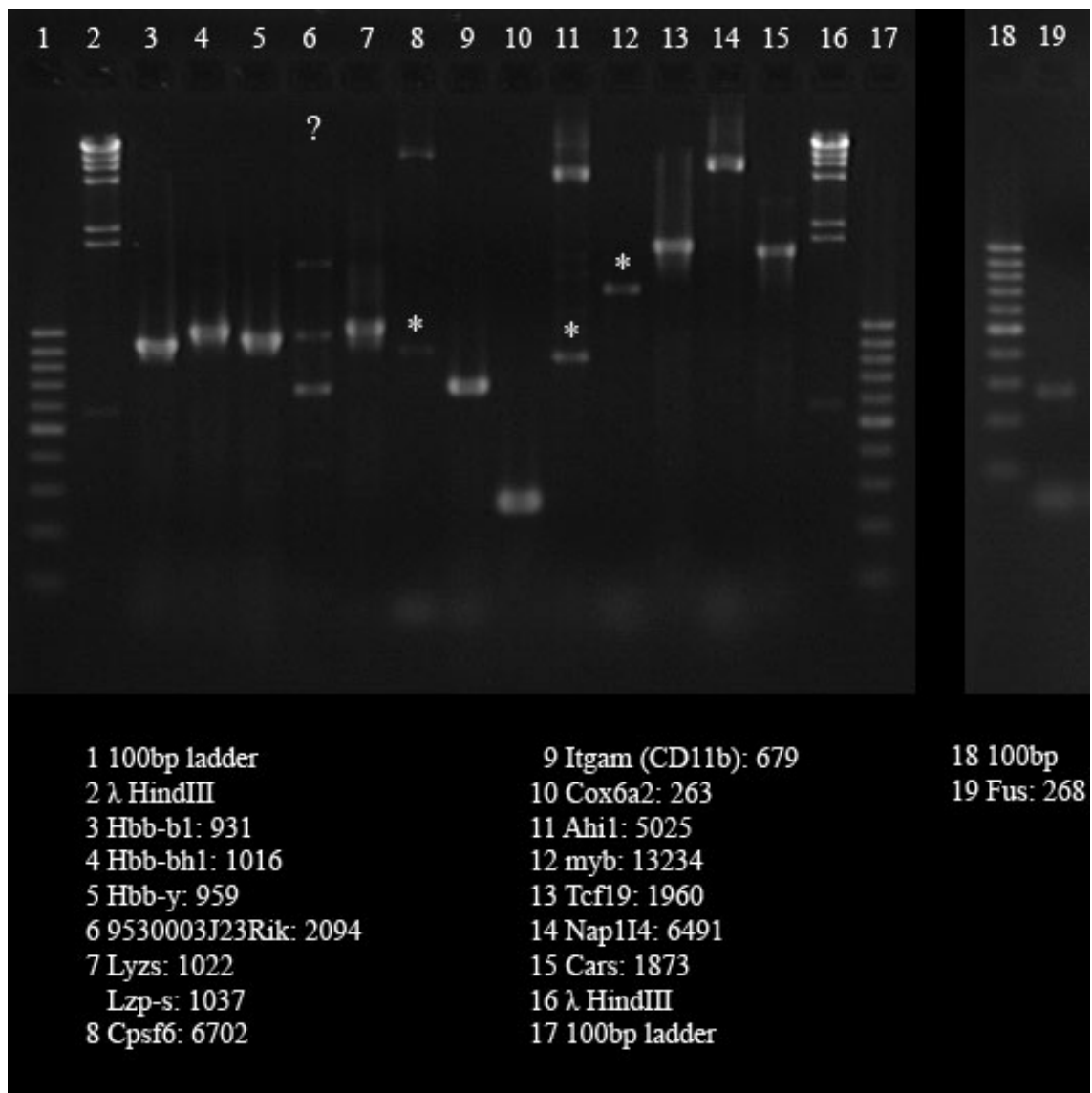


Abb. 27: Kontrolle einiger, für die RT-PCR konstruierter, Primer auf BAC-DNA (Spur 3-15). Dabei können lediglich Gene amplifiziert werden, die vollständig auf dem BAC liegen. Zusätzlich wird damit die BAC-Sequenz bestätigt. Angegeben ist die erwartete Bandenlänge in bp. Sternchen (*) kennzeichnen zusätzliche, unerwartete Banden, die durch ein mehrfaches Binden der jeweiligen Primer entstanden sind. Lediglich für das unbeschriebene Gen 9530003J23Riken (Spur 6) konnte keine eindeutige Positivkontrolle erbracht werden. Zwar sind drei Amplifikate zu erkennen, jedoch keines in der erwarteten Länge von 2094 bp. Für das Gen Fus, welches neben dem CD11b-BAC liegt, wurde eine RT-PCR auf MEF (mouse embryonic fibroblasts) - cDNA durchgeführt (Spur 19). Das 268 bp Amplifikat dient ebenfalls als Positivkontrolle für das entsprechende Primerpaar, da Fus in ES-Zellen nicht exprimiert wird.

2.4.6 Genspezifische PCR

Mit der gewonnenen cDNA wird letztendlich eine genspezifische RT-PCR durchgeführt.

RT-PCR Ansatz			
Menge	Stoff	Endkonzentration	
5 µl	PCR-Puffer mit 15 mM MgCl ₂ (Pharmacia)	10×	
4 µl	dNTP	je 2,5 mM	
2,5 µl	Forward Primer	10 µM (Endkonz.: 0,5 µM)	
2,5 µl	Reverse Primer	10 µM (Endkonz.: 0,5 µM)	
2 µl	Erstrang-cDNA	unverdünnt, 1:10 und 1:50	
33,5 µl	PCR-H ₂ O		
0,5 µl	Taq-Polymerase		
RT-PCR Programm			
Temperatur	PCR-Programm	Dauer	Zyklen
40°C	Vortemperieren	2 min	1×
94°C	Startdenaturierung	3 min	1×
94°C	Denaturierung	30 sec	35×
X°C	Anlagerung der Primer	30 sec	
72°C	Verlängerung / Synthese	45 sec	
72°C	Finale Verlängerung	5 min	1×
4°C	Endtemperatur zum Abkühlen	mehrere h möglich	-
X°C = optimale Annealing-Temperatur; für jedes Gen individuell unterschiedlich			

In dieser Arbeit wurden für jedes Gen drei Ansätze mit unterschiedlicher Verdünnung der cDNA hergestellt und alle Tubes nach 35 PCR-Zyklen gemeinsam entnommen. Die unterschiedliche Amplifikatmenge in den Ansätzen dienten als interne Kontrolle der Reaktion. Zusätzlich konnte damit die Expressionsstärke verschiedener Gene besser abgeschätzt bzw. verglichen werden.

Neben den zu untersuchenden Genen, wurde parallel für das Gen Actin eine PCR-Reaktion als Positivkontrolle durchgeführt. Actin ist in fast allen Zellen und somit auch in ES-Zellen stark exprimiert. Ebenso wurde als Negativkontrolle eine PCR ohne Zugabe von cDNA ausgeführt und diese stattdessen durch Wasser ersetzt. Die Reaktionen wurden in Gruppen mit ähnlichen Schmelztemperaturen eingeteilt und jeweils gemeinsam in die PCR-Maschine gegeben.

2.4.7 Gelelektrophorese der cDNA-Amplifikate

Letztendlich wurden je 5 µl der Amplifikate aus der Erststrang-cDNA PCR zusammen mit der Positiv- und Negativkontrolle auf ein 1,8% Agarosegel aufgetragen. PCR-Produkte eines Gens in der Verdünnungsreihenfolge 1:50, 1:10 und 1:1 wurden jeweils nebeneinander aufgetragen. Als Größenmarker wurde eine 100 bp Leiter und λHindIII verwendet. Das Gel lief bei 80 V und 120 mA für ca. 75 min.

2.5 Mikroskopie

2.5.1 Durchlicht- / Phasenkontrastmikroskopie

Zur Kontrolle aller Zellen in Kultur wurde das Phasenkontrastmikroskop **Axiocvert 25C** von Zeiss verwendet. Dieses ist mit folgenden Objektiven ausgestattet:

Bezeichnung	Vergrößerung	num. Apertur	Phasenkontrast
CP Achromat	5×	0,12	-
CP Achromat	10×	0,25	Ph1
LD Achroastigmat	20×	0,3	Ph1
Achroastigmat	40×	0,55	Ph2

Objektive des Phasenkontrastmikroskops Axiocvert 25C von Zeiss.

2.5.2 Epifluoreszenzmikroskop

Die Fluoreszenzmikroskopie ermöglicht es, mit Fluorochromen gefärbte Chromosomen oder DNA-Abschnitte sichtbar zu machen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Epifluoreszenzmikroskop **Axiophot 2** von Zeiss mit drei verschiedenen Objektiven verwendet, um Metaphasepräparate aufzunehmen und dabei die Qualität der Chromosomenpräparate und die Lage der zugehörigen BACs zu beurteilen, sowie Antikörperdetektionen zu begutachten. Ferner wurde das Ergebnis von 3D-FISH auf allen Zelltypen kontrolliert bzw. überprüft, ob die Signale der DNA-Sonden intensiv genug sind, um die Zellen am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop aufzunehmen.

Jedes Fluorochrom besitzt aufgrund seiner charakteristischen Elektronenanordnung ein ganz spezifisches Anregungs- und Emissionsspektrum. Es kann mit Hilfe einer Quecksilberdampflampe und einer Kombination spezieller Filter, sowie eines Strahlenteilers sichtbar gemacht werden. Der Anregungsfilter reduziert dabei das weiße Licht der Lampe auf eine geringe Spektrumbreite. Der dichromatische Strahlenteiler ist ein Filter, der das vom Objekt ausgestrahlte, längerwellige Licht passieren lässt, die Anregungswellen jedoch spiegelt und somit ein Überlappen von Anregungs- und Emissionswellen verhindert. Durch den Emissionsfilter gelangen nur ausgewählte, für das jeweilige Fluorochrom spezifische, Emissionswellenlängen zum Auge oder zur CCD-Kamera.

Die von der gekühlten CCD-Kamera eingefangenen Bilder werden mit der Software *MetaVue* der Firma *Universal Imaging Corporation* aufgenommen. Die einzelnen Fluorochromsignale werden dabei getrennt fotografiert und als Pixel mit definiertem Grauwert dargestellt. Durch spätere individuelle Farbzuzuordnung und Überlagerung der Einzelbilder in *Adobe Photoshop* kann schließlich ein farbiges Gesamtbild erzeugt werden.

Objektivklasse	Vergrößerung	num. Apertur	Phasenkontrast
Plan-Neofluar	40× Öl	1,3	Ph3
Plan-Apochromat	63× Öl	1,4	Ph3
Plan-Neofluar	100× Öl	1,4	Ph3

Objektivklassen und Filtersätze des Epifluoreszenzmikroskops Axiophot 2 von Zeiss.

Fluorochrom	Farbe des Anregungslichts	Anregungsmaximum (nm)	Farbe des emittierten Lichts	Emissionsmaximum (nm)	Anregungsfilter (1) Strahlenteiler (2) Emissionsfilter (3)		
					(1)	(2)	(3)
DAPI	ultraviolett	355	blau	450	BP 365	FT 395	LP 450-490
GFP	blau	488	grün	507	BP 450-490	FT 510	LP 515-565
Alexa488 FITC	blau	495	grün	520	BP 450-490	FT 510	LP 515-565
Cy3	grün	550	orange	570	BP 546	FT 580	LP 590
Cy5	orange	649	dunkelrot	670	BP 575-625	FT 645	LP 660-710
TOPRO-3	orange	642	dunkelrot	661	BP 575-625	FT 645	LP 660-710

Verwendete Fluorochrome, Filtersätze und Strahlteiler des Epifluoreszenzmikroskops Axiophot 2 von Zeiss.

2.5.3 Inverses Fluoreszenzmikroskop

Ein inverses Fluoreszenzmikroskop wurde ebenfalls verwendet. Es diente v.a. der Aufnahme von Makrophagen auf Deckgläsern mit Gitternetz vor und nach der FISH (siehe 2.1.8). Das verwendete Mikroskop von *Visitron* (Puchheim) basiert auf einem inversen **Zeiss-Axiovert 200M** und einer CCD Kamera *Spot RT SE* von *Diagnostic Instruments*. Es besitzt einen motorisierten xy-Tisch und die Bildaufnahme erfolgt mit der Software *Metamorph* der Firma *Universal Imaging Corporation*. Die verwendeten Objektive besitzen 10×, 20×, 40×, 63× und 100× Vergrößerung. Die Pixelgröße der Kamera beträgt 6,45 µm.

Filter	Anregungsfilter (nm)	dichromatischer Strahlenteiler	Emissionsfilter (nm)
DAPI	360 ± 40	400DCLP	470 ± 40
FITC	470 ± 40	Q497LP	522 ± 40
Cy3	546 ± 11	Q557LP	567 ± 15
Cy5	622 ± 36	Q647LP	667 ± 30

Verwendete Fluorochrome, Filtersätze und Strahlteiler des inversen Fluoreszenzmikroskops von Visitron.

2.5.4 Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop (LSM)

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene konfokale Laser-Scanning-Mikroskope verwendet, das **Zeiss LSM 410** und das **Leica TCS SP2**.

Ein konfokales LSM bietet, im Gegensatz zum normalen Fluoreszenzmikroskop, die Möglichkeit der dreidimensionalen Analyse von Zellkernen. Dabei können Bilder in verschiedenen

Fokusebenen erstellt werden. Durch sukzessives Verschieben der gescannten Ebene in z-Richtung entstehen Bildstapel (stacks), die in ihrer Gesamtheit das Objekt in seiner dreidimensionalen Ausdehnung repräsentieren. Möglich wird dies durch monochromatisches Laserlicht zum Anregen der Fluorochrome. Der Laserstrahl wird auf einen Punkt im Präparat fokussiert, wobei eine Lochblende, die brennpunktgleich (konfokal) zum fokussierten Lichtstrahl angebracht ist, das Streulicht ober- und unterhalb der Fokusebene ausschließt. Die Fluoreszenzsignale bzw. Bildpunkte aus einer Brennebene werden von einem Photomultiplier erfasst, ohne dass Streulicht aus der Tiefe des Präparats den Kontrast verschlechtert.

Der Scannvorgang kann in jedem Kanal beliebig oft wiederholt werden, wodurch das elektronische Rauschen herausgefiltert wird (Average). Meist wurde mit einem **Average-Wert** von **4** aufgenommen, was einen guten Kompromiss zwischen Bildqualität und Ausbleichen der Präparate darstellt. Für alle Aufnahmen wurde ein **63× Öl / 1,4 Objektiv** und eine **Pinhole** Einstellung von ungefähr **einer Airy Disc** verwendet. Die **Bildgröße** der aufgenommenen Bilder beträgt meist **256×256** oder **512×512** Pixel, bei einer **Voxelgröße** von ca. **80×80×250 nm³** oder weniger.

Fluorochrom	Laser (Wellenlänge / Leistung)	Emissionsfilter
Cy3	HeNe-Laser (543 nm / 0,5 mW)	BP 575-640 nm
Cy5	HeNe-Laser (633 nm / 5 mW)	LP 665 nm
FITC / Alexa488 / GFP	Argon-Laser (488 nm / 15 mW)	BP 510-525 nm

Laser und Filtereinstellungen des LSM 410 von Zeiss.

Fluorochrom	Laser (Wellenlänge / Leistung)	Emissionsfilter
DAPI	Diode Laser (405 nm / 25 mW)	410-460 nm
Cy3	DPSS Laser (561 nm / 10 mW)	565-580 nm
Cy5	HeNe-Laser (633 nm / 10 mW)	660-750 nm
FITC / Alexa488 / GFP	Argon-Laser (488 nm / 200 mW)	490-550 nm
Texas Red / Cy3.5	HeNe-Laser (594 nm / 2,5 mW)	nicht verwendet

Laser und Filtereinstellungen des TCS SP2 von Leica. Die Breite des Emissionsfilters kann bei diesem Mikroskop individuell eingestellt werden.

Im Falle des Leica TCS SP2 wird die Laserstärke so hoch wie möglich gewählt, ohne ein sichtbares Ausbleichen der Signale zu verursachen. Ausnahme ist der besonders leistungsstarke Argonlaser. Dieser muss gedrosselt werden, um ein sofortiges Ausbleichen der entsprechenden Fluorochrome (FITC, GFP und Alexa488) zu vermeiden. Eine geringe Photomultiplier Spannung verhindert Überbelichtung sowie elektronisches Rauschen und ermöglicht Bilder, welche den gesamten Grauwertbereich von 0 bis 255 abdecken. Spannung (Voltage) und Offset werden so gewählt, dass keine Unterbelichtung auftritt. Die Filterbreite wird so eingestellt, dass emittiertes Licht anderer Farbkanäle nicht detektiert wird, die Signalintensität aber dennoch ausreichend hoch ist.

Die Darstellung der Signale erfolgt mittels entsprechender LSM-Software als einzelne Pixel mit bestimmten Grauwerten. Jeder Farbkanal wird dabei einzeln aufgenommen und die Rohbilder anschließend mit verschiedenen Programmen weiterbearbeitet.

2.6 Bildverarbeitung

2.6.1 Bildbearbeitung und Shift-Korrektur

Die Rohbilder der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskope wurden entweder bereits von der Leica TCS SP2 Mikroskopsoftware oder, bei Bildern des Zeiss 410, mit der Software *ImageJ* (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) zu TIF-Bildstapeln zusammengefasst. Dabei kamen die einzelnen Farbkanäle hintereinander zu liegen.

Mit Hilfe eines *ImageJ*-Makros wurden diese TIF-Stapel in die verschiedenen Farbkanäle zerlegt. Für jede aufgenommene Struktur, wie beispielsweise einen einzelnen Zellkern, existierten nun entsprechend der Anzahl verwendeter Farbkanäle Bildstapel mit identischer Zahl an Einzelbildern bzw. Schnitten. Das Makro normalisierte die Bilder auf 256 Grauwerte und führte die entsprechende Shift-Korrektur durch (Abb. 28). Damit wird die jeweilige chromatische Aberration des Mikroskops in z-Richtung korrigiert. Evtl. angrenzende Zellkerne wurden manuell aus den Bildstapeln geschnitten, da ihre Signale spätere Auswertungen verfälschen könnten. Die Bildstapel der Einzelkanäle wurden in Form von Grauwertbildern getrennt abgespeichert und Gauß-gefiltert. Sie dienten als Vorlage für die radiale Auswertung (siehe 2.7.3). Schließlich wurden den Kanälen Falschfarben zugewiesen und automatisch RGB-stacks und RGB-Projektionen erstellt.

Farbkanal	Shift in Pixeln (DAPI als Referenz)			Shift in nm (DAPI als Referenz)		
	x	y	z	x	y	z
DAPI	0	0	0	0	0	0
FITC	1,575	-1,08	-1,409	78,75	-54	-169,1
Cy3	0,673	-0,512	-0,427	33,65	-25,6	-51,24
Cy5	-0,244	0,663	1,589	-12,2	33,15	190,64

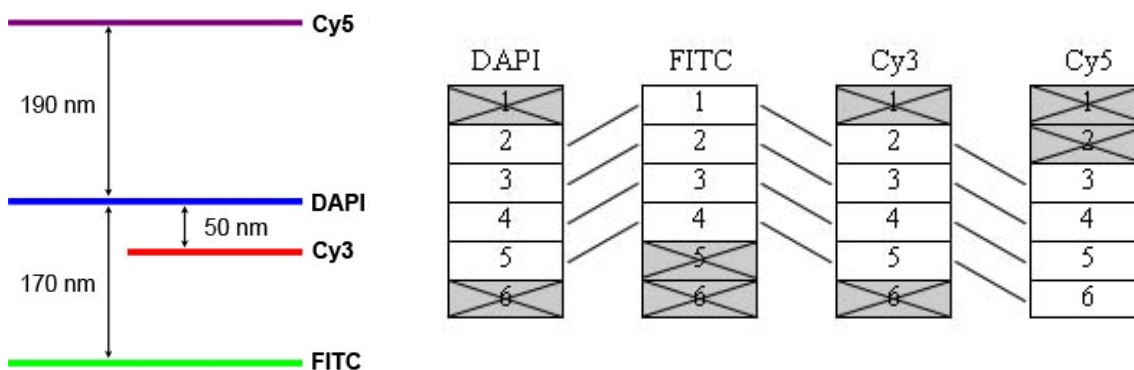


Abb. 28: Z-Shift-Korrektur für Bildstapel des LSM. Dazu werden Multicolor-Beads mit einer Voxelgröße von $50 \times 50 \times 120 \text{ nm}^3$ in den vier verwendeten Farbkanälen (DAPI, FITC, Cy3 und Cy5) aufgenommen. Oben: Die Tabelle zeigt beispielhaft den jeweiligen Shift in Pixeln und nm. Der Shift in x und y wird vernachlässigt und nicht korrigiert. Unten links: Z-Shift bzw. schematische Darstellung der Abstände zwischen den einzelnen Kanälen. Unten rechts: Entsprechende Shiftkorrektur in z bei einem Bildabstand von 200 nm.

Ebenfalls mit *ImageJ* wurden die maternalen Pferd- und paternalen Eselsignale der Maultier 3D-Präparate voneinander subtrahiert, um Kreuzhybridisierungssignale zu eliminieren (siehe radiale Verteilung subtrahierter Signale in 3.4.3.1, Abb. 59). Beide Arten unterscheiden sich zwar ausreichend in ihren repetitiven Sequenzen, um einzelne Metaphasechromosomen eindeutig zuordnen zu können, jedoch kommt es auch zu Kreuzhybridisierung, was v.a. bei der Auswertung in Interphasekernen problematisch werden kann. Deshalb wurden die Bildstapel beider Arten geöffnet und jeweils voneinander abgezogen. Eselsignale abzüglich Pferdesignale ergibt Signale, die eindeutig ihren Ursprung in der Eselsequenz haben. Pferdesignale abzüglich Eselsignale ergibt Signale, welche ausschließlich von der Pferdesonde stammen können. Als Ausgangsmaterial wurden normalisierte, jedoch nicht Gauß-gefilterte Bilder verwendet. Anschließend wurde die radiale Verteilung der Signale untersucht und mit der Verteilung der Originalsignale ohne Subtraktion verglichen.

Alle weiteren Bildbearbeitungen wurden mit *Adobe Photoshop CS2* durchgeführt, wobei die Farbkanäle aller RGB-Projektionen getrennt voneinander bearbeitet wurden. Außerdem wurden sämtliche Beschriftungen mittels Photoshop erstellt, sowie jegliches Anordnen und Zuschneiden von Bildern.

2.6.2 3D-Rekonstruktion aus Bildstapeln

Mit dem Softwareprogramm *AMIRA* wurden von einigen, mit dem LSM aufgenommenen, Maultier-Prometaphasen und -Interphasekernen 3D-Rekonstruktionen erstellt (siehe 3.4.3.2 und beigelegte CD), um die räumliche Verteilung maternaler und paternaler DNA besser darstellen zu können.

Die Grauwert-Bildstapel der drei Kanäle (Pferdesignale, Eselsignale und DAPI) wurden dazu in *AMIRA* geöffnet, die Auflösung auf 256×256 Pixel gesenkt und die gewünschten Falschfarben zugeordnet (z.B. grün für Eselsignale, rot für Pferdesignale und blau für die DAPI-Gegenfärbung). Mit dem Abstand bzw. der Voxelgröße (x, y, z) der einzelnen Bilder eines Stapels berechnete das Programm eine dreidimensionale Darstellung der Oberflächen des gesannten Objekts. Anschließend wurde ein Gauß-Filter und die Funktion „edge preserving smoothing“ angewandt. Dies führte zu einer Glättung der Flächen, ohne die Signalübergänge zu verwischen. Dabei sollten sich die Signale möglichst deutlich vom Hintergrund abheben, ohne ihre Ausdehnung zu verändern. Bei den Prometaphasen mussten einzelne Chromosomen gut zu erkennen und aufgrund ihrer Signale der Herkunftsspezies zuzuordnen sein. Zur Darstellung der Zellen oder Metaphasen wurde mit der sogenannten „isosurface“ und „ortho-/oblique-slices“ gearbeitet. Die erstellten 3D-Rekonstruktionen wurden in der vorliegenden Arbeit zweidimensional abgebildet (siehe Abb. 62).

2.7 Quantitative Auswerteverfahren

2.7.1 Auszählen von Signalclustern in Maultierzellen

Mit Hilfe der Software *ImageJ* wurden die Signalcluster von maternalen Pferd- und paternalen Eselsonden auf Maultier 3D-Präparaten untersucht. Dazu wurden die Bildstapel geöffnet, den Signalen rot und grün als Falschfarbe zugeordnet und partiell oder ganz überlappende Signalcluster bzw. Chromozentren (gelb) manuell ausgezählt (siehe Tabelle 12).

2.7.2 3D-RRD (Relative Radial Distribution)

Die Software 3D-RRD dient der Messung radialer Verteilungen innerhalb kugelförmiger Strukturen wie z.B. einem Zellkern. Sie wurde von J. v. Hase (Kirchhoff Institut, Universität Heidelberg) mit C++ in Khoros entwickelt und läuft unter dem Betriebssystem Linux.

Berechnungen mit diesem Programm dienen vor allem dem Abgleich mit EDMT-Ergebnissen (siehe 2.7.3), sowie dem Vergleich mit Auswertungen früherer Experimente, als EDMT in der heutigen Version noch nicht existierte. Vorlage sind, genau wie bei EDMT, die bearbeiteten Grauwert-Bildstapel der einzelnen Farbkanäle. Die im Rahmen dieser Arbeit berechneten Ergebnisdateien befinden sich auf der beigelegten CD.

Zunächst müssen für alle Farbkanäle sog. V-Werte (Verhältnis von hellen und dunklen Pixeln im Bild) bestimmt werden, die wie ein Schwellenwert über die Größe der zu segmentierenden Signale entscheiden. Den Mittelpunkt und die Grenze des Kerns berechnet das Programm anhand einer Projektion der DNA-Gegenfärbung. Danach wird der Radius des jeweiligen Zellkerns normiert und in 25 gleich dicke, konzentrische Schalen unterteilt. Die Verteilung der Signale wird über ihren relativen DNA-Gehalt in den verschiedenen Schalen bestimmt. Dazu wird die Helligkeit der Pixel normiert, indem den jeweils hellsten Pixeln der Tonwert 255 (weiß) zugeordnet wird. Um das Rauschen der Messung zu minimieren, wird das Bild geglättet und zusätzlich ein Schwellenwert definiert, unterhalb dem alle Pixel den Tonwert 0 (schwarz) erhalten. Dadurch erhöht sich der Kontrast des Bildes und die Grenzen der Signale werden schärfer. Die Ergebnisse werden schließlich in einen Graphen übertragen. Auf der Abszisse wird der relative Radius in Prozent und auf der Ordinate der relative DNA-Gehalt des Signals in der jeweiligen Schale angetragen.

Die Dissertation von J. v. Hase (2002) sowie die Veröffentlichung von Cremer und v. Hase (2001a) beschreiben das Prinzip des 3D-RRD Auswertungsprogramms im Detail.

2.7.3 EDMT (Enhanced Distance Measurement Tool)

EDMT wurde von T. Thormeyer (LMU, München) entwickelt. Es enthält das Unterprogramm eADS (enhanced Absolute Distance to Surface), welches nach einem Programm von J. v. Hase (Kirchhoff Institut, Universität Heidelberg) in Mathematica neu geschrieben wurde. EADS dient der Berechnung von Abständen dreidimensionaler Objekte zu einer dreidimensionalen Oberfläche unter Berücksichtigung der Signalintensität (Albiez 2006).

In der vorliegenden Arbeit wurden mit Hilfe dieses Programms Abstände von BAC-Signalen und Chromosomenpaints zur Zellkernoberfläche, sowie Abstände von BAC-Signalen zur Oberfläche ihres jeweiligen Chromosomenterritoriums gemessen. Alle mit dem Programm berechneten Ergebnisdateien befinden sich auf der beigelegten CD.

Vorlage für die Berechnung sind die mit *ImageJ* bearbeiteten Grauwert-Bildstapel der einzelnen Farbkanäle (siehe 2.6.1). Will man gegen die Chromosomenstruktur als Referenz messen, so müssen die beiden Territorien mit den entsprechenden BAC-Signalen in *ImageJ* manuell getrennt werden. Das funktioniert nur, wenn diese unterschiedliche Positionen im Kern einnehmen und nicht überlappen. Die BACs müssen ihrem jeweiligen Territorium eindeutig zuzuordnen sein.

Für jeden Bildstapel wird in *ImageJ* ein Schwellenwert gesetzt, welcher das Signal ohne störenden Hintergrund wiedergibt. Bei Chromosomenterritorien ist ein sorgfältig gewählter Wert wichtig, um das Signal nicht in seiner Ausdehnung zu verändern, da dies die Lage der BAC-Signale innerhalb des Territoriums beeinflussen würde. Besonders vorsichtig muss auch bei den

DAPI- oder TOPRO-Gegenfärbungen vorgegangen werden. Da alle untersuchten Zellkerne aus Mauszellen stammen, besitzen sie sehr hell gefärbte Chromozentren mit schwach gefärbten umliegenden DNA-Bereichen. Wählt man den Schwellenwert zu hoch, so weist die Kernoberfläche „Löcher“ auf, welche die späteren Berechnungen verfälschen. Alle ermittelten Schwellenwerte werden notiert, aber nur für die Referenzstruktur wie Zellkern oder Chromosomenterritorium tatsächlich gesetzt. Bezogen auf die dadurch entstehenden schwarz (außen) - weiß (innen) 3D-Strukturen, werden die radialen Abstände der Signale, sowie der Referenzstruktur selbst gemessen.

Zusammen mit der Voxelgröße werden die Schwellenwerte für alle Kanäle jedes Zellkerns oder jedes Territoriums in eine Parameterdatei (EDMT FileMaker) eingegeben, auf die das Programm bei seiner Berechnung zurückgreift. Für eine maximale Berechnungsgeschwindigkeit kann man je nach Art der Signale zwischen einer iterativen und nicht-iterativen Art der Berechnung wählen.

Nach der Auswertung wird ein Graph ausgegeben, der die gemittelten Häufigkeiten aller Kerne oder Territorien für alle Kanäle anzeigt. Diese sind in Klassen von je 250 nm unterteilt, welche entsprechend dem Bildabstand in z gewählt wurden. Klassen innerhalb der Referenzstruktur erhalten Werte mit negativem, Klassen außerhalb mit positivem Vorzeichen. In einem Excel-Diagramm werden für jeden Farbkanal bzw. jedes Signal die gemittelten Häufigkeiten in Prozent, welche dem relativen DNA-Gehalt entsprechen, gegen den Abstand zur Kern-/Territorienoberfläche in μm aufgetragen. Aus der Standardabweichung des Mittelwerts (SD-Mean) ergibt sich der jeweilige Fehlerindikator jeder Kurve.

Des Weiteren enthält die Auswertungsdatei die gewichteten Signalthäufigkeiten aller einzelnen Zellkerne oder Territorien, nach Kanälen sortiert und ebenfalls in 250 nm Klassen geordnet. Dies ist zum Erkennen von Fluktuationen in einem Experiment hilfreich.

Letztendlich werden statistische Werte wie z.B. Mediane und arithmetische Mittelwerte aller ausgewerteten Zellkerne oder Territorien ausgegeben. Diese liegen sowohl in gewichteter (nach der Intensität der Voxel), als auch in ungewichteter Form vor. Sie sind die Grundlage für statistische Auswertungen (siehe 2.8).

2.7.4 Normalisierung der Signalverteilung und Kerngröße

Mit Hilfe des Programms EDMT wurde in einer zusätzlichen Berechnung die Größe aller Zellkerne eines Experiments anhand der DNA-Gegenfärbung normiert. Dabei erhalten alle Zellkerne den gleichen maximalen Kernradius. Dieser wird in zehn gleichgroße Schalen eingeteilt. Anschließend wird die quantitative, radiale Signalverteilung neu berechnet (siehe Abb. 42). Die unterschiedliche Kernform wird dabei nicht berücksichtigt.

Um einen Vergleich der Anordnung in verschiedenen Zelltypen mit unterschiedlichen Kernformen zu ermöglichen, wurden in einem weiteren Auswertungsansatz die mit EDMT berechneten Signalverteilungen von Genloci anhand der DNA-Verteilung normalisiert. Lag entweder der DNA-Gehalt oder das Genlocussignal, mit einem bestimmten Abstand zur Kernoberfläche, unter 4% des gesamten Signals, so wurden die entsprechenden Werte von weiteren Berechnungen und Diagrammen ausgeschlossen. Damit wurden unnatürlich hohe Verhältnisse aufgrund zufälliger Ergebnisse für kleine absolute Werte verhindert. Abhängig von der Verteilung ergaben sich auf diese Weise zwischen vier und neun normalisierte Datenpunkte pro Genlocus und Zelltyp. Diese wurden in Form eines Graphen mit dem Diagramm-Zeichenprogramm SigmaPlot dargestellt (siehe Abb. 45).

2.7.5 Objektzählprogramm

Das in dieser Arbeit verwendete Objektzählprogramm OC-2 (Object Counting 2) wurde ursprünglich von S. Stein entworfen (Stadler 2004) und anschließend von J. v. Hase (beide am Kirchhoff-Institut für Physik der Universität Heidelberg) und S. Dietzel (Department Biologie II der LMU München) weiterentwickelt. Es ermittelt die Anzahl von Objekten in einem Bildstapel bei schrittweiser Erhöhung des Schwellenwerts. Grauwerte, die unter dem entsprechenden Schwellenwert liegen werden gleich Null gesetzt und alle Objekte, die aus mehr als 10 Voxeln bestehen, gehen in die Zählung ein. Voxel werden dann zu einem Objekt gezählt, wenn sie mit einem Nachbarvoxel entweder eine Fläche, eine Kante oder eine Ecke teilen (26 mögliche Nachbarn pro Voxel). Mit steigenden Schwellenwerten zerfallen große Objekte in kleinere Untereinheiten, die schließlich ganz verschwinden. Das Programm analysiert 8-Bit-Bilder, die 256 Grauwerte aufweisen. Bildstapel wurden zunächst Gauß-gefiltert, normalisiert und mit Schwellenwerten zwischen 20 bis 255 untersucht, wobei dieser in Schrittweiten von 5 erhöht wurde. Eine sehr detaillierte Beschreibung des Programms mit entsprechenden Abbildungen befindet sich in der Dissertation von R. Mayer (2006). Für Wahrscheinlichkeitsberechnungen bezüglich aller Kerne, wurde die maximale Objektzahl bei einem Schwellenwert über 90 verwendet, um einen Einfluss der Hintergrundfluoreszenz zu vermeiden.

2.8 Statistische Auswertung

2.8.1 Vergleich normalisierter Verteilungen

Ein statistischer Vergleich zwischen den normalisierten Genlocus-Verteilungen verschiedener Zelltypen (siehe 2.7.4) erfolgte in drei Schritten. Zuerst wurde mittels eines quadratischen Polynoms eine Kurve mit dem "regression wizard" von Sigma Plot 10.0 (SPSS Inc.) angepasst. Für weitere Berechnungen wurde diejenige Kurve ausgewählt, welche am besten an die Datenpunkte angepasst war. Folgende R^2 Werte wurden dabei ermittelt: *Albumin* in ES-Zellen 0.99, β -*Actin* in Myoblasten 0.98, β -*Globin* in Makrophagen 0.99, *CD11b* in Makrophagen 0.91, *Lysozym* in Makrophagen 0.89, *Myb* in ES-Zellen 0.84, *Oct3/4* in ES-Zellen 0.91 und *Mpo* in Makrophagen 0.95 (untersuchte Genloci, siehe Abb. 22). Im zweiten Schritt wurde für jeden experimentellen Datenpunkt die Differenz zum entsprechenden Wert der angepassten Kurve im Quadrat berechnet. Dies wurde für alle Genloci bezüglich des Abstands zur Kernoberfläche gemacht. Im dritten Schritt wurden die Differenzen im Quadrat statistisch miteinander verglichen (Sigma Stat). Für Vergleiche zwischen zwei Zelltypen wurde der Mann-Whitney-Rank-Sum-Test, bei drei untersuchten Zelltypen (β -Actin/Albumin und Oct3/4) ein Kruskal-Wallis One Way ANOVA angewandt. Diese Berechnungen wurden von J. Peters (Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin, LMU München) durchgeführt. Sie sind in Hepperger et al. (2008) beschrieben.

2.8.2 Berechnung von p-Werten

Mit Hilfe des Wilcoxon-Signed-Rank-Test wurden die Verteilungen absoluter Abstände von Signalen zu einer Referenzstruktur miteinander verglichen. Anhand der EDMT-Ergebnisdatei wurden für alle Signalvergleiche innerhalb einer Zellpopulation die entsprechenden p-Werte ermittelt. Das beinhaltet sowohl die radiale Verteilung von Signalen wie z.B. BACs in Bezug auf das entsprechende Territorium (siehe Tabelle 6), als auch von BACs und Chromosomen-paint bezüglich des Zellkerns (siehe Tabelle 7).

Zur Berechnung der p-Werte wurde das Programm *SigmaStat 3.0* (SPSS, Chicago, IL, USA) verwendet. Dabei wurden jeweils paarweise die gewichteten Mittelwerte (W-Mean) der Signale aller Kerne oder Territorien miteinander verglichen. Ein Wert von $p > 0,05$ bedeutet einen nicht signifikanten Unterschied, $p \leq 0,05$ einen signifikanten und $p \leq 0,001$ einen hochsignifikanten Unterschied der Signalverteilung.

2.8.3 Berechnung des Anteils repetitiver Elemente eines Genlocus

Der prozentuale Anteil repetitiver Elemente des jeweiligen Genlocus, wurde anhand eines 2 Mb (siehe Tabelle 8) und 10 Mb Fensters (siehe Tabelle 9) für jeden BAC untersucht. Dazu wurde im *NCBI Map Viewer* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genomes>) nach dem entsprechenden BAC gesucht und dessen Mitte mit Hilfe der Grenzen der angezeigten Region ermittelt. Ausgehend von der Mitte wurde ein 2 Mb Fenster berechnet, indem je 1 Mb stromauf- und stromabwärts die neuen Grenzen des Abschnitts festgelegt wurden. Die Anzahl der Gene und CpG-Inseln wurde direkt im Web Browser abgelesen. Diese 2 Mb wurden kopiert und die gesamte Sequenz in das Programm *RepeatMasker* (version open-3.1.6, www.repeatmasker.org) geladen. Hier wurde der prozentuale Anteil sämtlicher Elemente wie SINEs, LINEs, bestimmter LTRs und der GC-Gehalt berechnet. Diese Werte wurden von S. Dietzel (LMU, München) ermittelt und zur Berechnung des Pearson Korrelationskoeffizienten benötigt.

2.8.4 Pearson-Korrelationskoeffizient

Der Pearson-Koeffizient R ist ein Maß für die Korrelation von durchschnittlicher Genposition und verschiedenen genomischen Eigenschaften. Die Werte wurden von S. Dietzel (LMU, München) in Microsoft Excel 2003 berechnet.

Zuerst wurde der durchschnittliche Abstand jedes Genlocus bzw. BACs zur Kernoberfläche in einer Zellpopulation berechnet, indem die von EDMT ausgegebenen, gewichteten Mittelwerte (W-Mean) der einzelnen Kerne nochmals gemittelt wurden. Aus der Korrelation dieser mittleren Genposition mit der Häufigkeit bestimmter genomischer Elemente errechnet sich der Pearson-Korrelationskoeffizient R. Ein negativer Wert bedeutet eine negative, ein positiver Wert eine positive Korrelation. Je größer der Wert, desto stärker die jeweilige Korrelation oder Antikorrelation. Ein Wert von 1 würde eine hundertprozentige Übereinstimmung bedeuten. Aus dem Koeffizient R berechnet sich wiederum das Bestimmtheitsmaß R^2 .

3 Ergebnisse

3.1 Transfektion differenzierungsfähiger Mauszellen mit dem lac-Operator/lac-Repressor-GFP System

Ziel dieses Teils der vorliegenden Arbeit war die stabile Transfektion von mES-Zellen mit dem lac-Operator/lac-Repressor-GFP System (siehe 1.2 und 2.2). Diese sollte in punktförmigen Fluoreszenzsignalen im Zellkern resultieren, die auch nach Differenzierung der Zellen lokalisiert werden können. Damit hätte man ein System, um die räumliche Organisation von Chromatin in vivo über einen längeren Zeitraum, in verschiedenen Zelltypen und während der Differenzierung verfolgen zu können.

Stammzellen reagieren gegenüber Veränderungen in den Kulturbedingungen, wie sie während einer Transfektion auftreten, sehr empfindlich. Unter Umständen verlieren sie ihre pluripotenten Eigenschaften, indem sie spontan ausdifferenzieren. Um verschiedene Transfektionsmethoden (siehe 2.2.3) zu testen und die Bedingungen zu optimieren, wurden zunächst differenzierbare Maus-Myoblasten transfiziert (Abb. 29). Das lac-Operator/lac-Repressor System wurde außerdem bereits zuvor in Murinen Erythroleukämie (MEL) Zellen erfolgreich etabliert (Dietzel 2004).

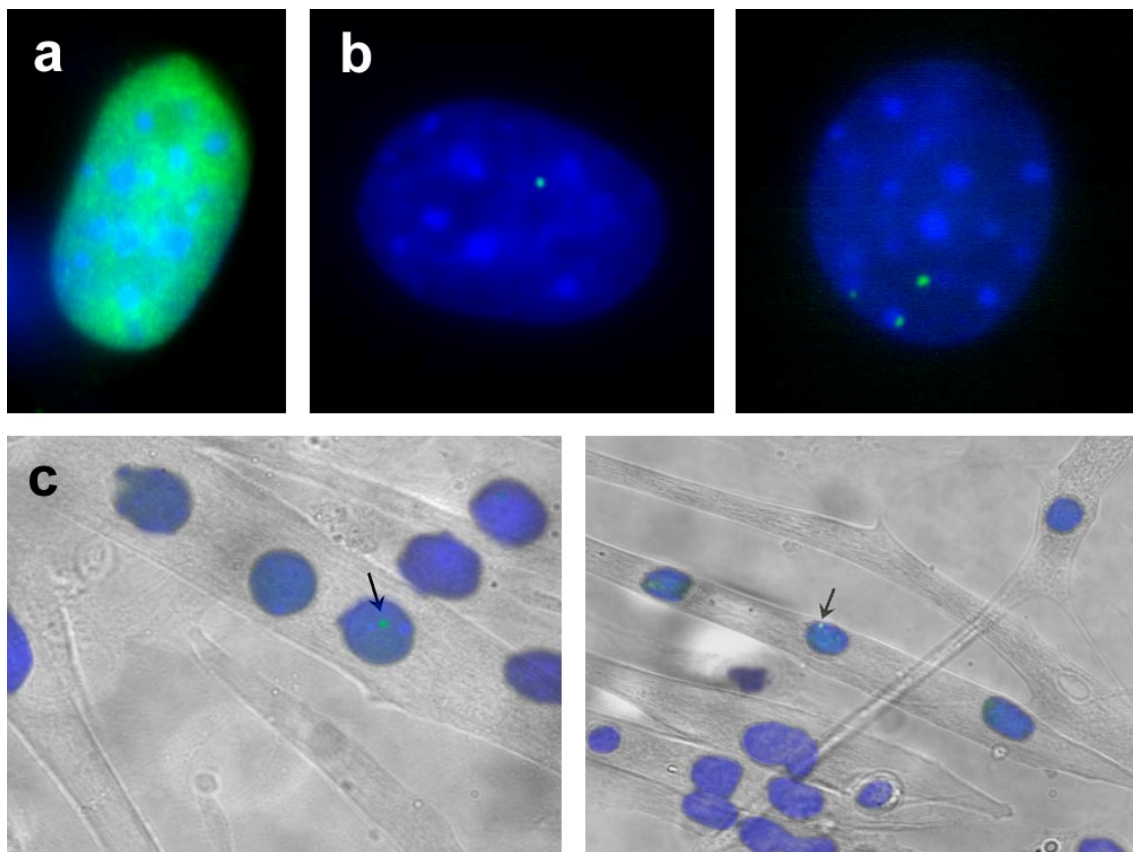


Abb. 29: Transfektion von Myoblasten mit dem lac-Repressor-GFP (a) führt zu grüner Hintergrundfluoreszenz. Transfektion mit dem kompletten lac-Operator/lac-Repressor-GFP System führt zu einem oder mehreren punktförmigen Signalen (b), die auch nach der Differenzierung zu Myotuben zu erkennen sind (c). Abbildungen aus der Diplomarbeit (Hepperger 2002) übernommen.

3.1.1 Neuklonierung, Sequenzierung und Transfektion des lac-Operator Plasmids pLys-8.8

Neben den bereits erwähnten Konstrukten pPS-8.8 und pPALZ8.8 (siehe Abb. 16) wurde, wie unter 2.2.2 beschrieben, ein weiteres lac-Operator Plasmid neu kloniert. pLys-8.8 (Abb. 30) beinhaltet ein Lysozym-Transgen, welches nach Integration in mES-Zellen mittels Differenzierung zu Makrophagen parallel zum endogenen Lysozym M (Cross 1990) aktiviert werden kann (Faust 1994) (Übersicht s. Bonifer 1997). Mit Hilfe eines fluoreszenzgekoppelten lac-Repressors könnte dieses Transgen sichtbar gemacht werden.

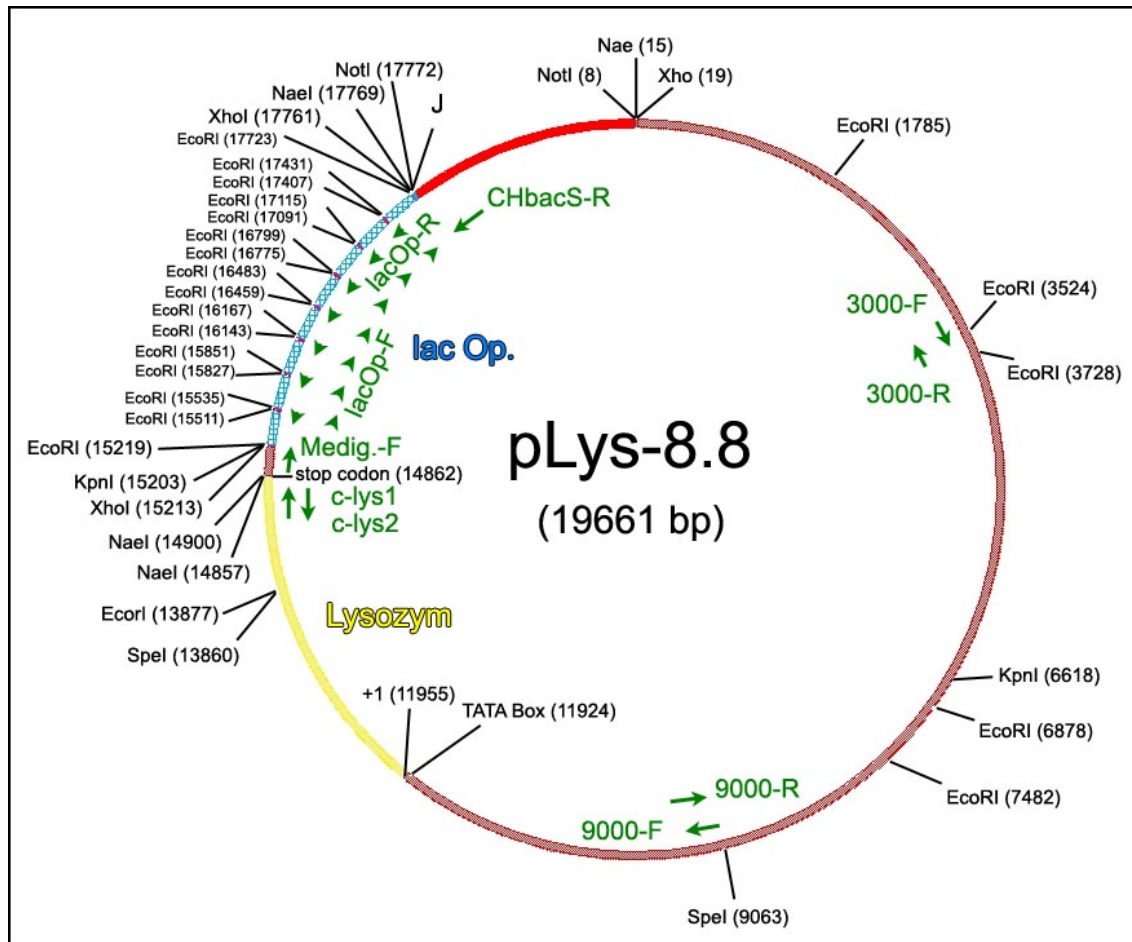


Abb. 30: Der neu klonierte Vektor pLys-8.8. Er enthält ein Lysozymgen (gelb) mit der zugehörigen LCR und eine lac-Operator Wiederholungssequenz (blau). Die Abbildung zeigt die im Kontrollverdau verwendeten Restriktionsschnittstellen einschließlich NotI, mit deren Hilfe das Plasmid für die Transfektion linearisiert werden kann. In grün sind die Bindungsstellen der Primerpaare für die Kontroll-PCR dargestellt (siehe 2.2.5). pLys-8.8 muss mit einem weiteren Plasmid cotransfiziert werden, da es keine eigenen Resistenzgene für die Selektion in Eukaryoten besitzt.

Das neu konstruierte Plasmid wurde anschließend teilsequenziert (Medigenomix, Martinsried). Dabei stellte sich heraus, dass die lac-Operator Einheiten invertiert vorliegen, was jedoch ihre Funktion als lac-Repressor Bindestelle nicht einschränken sollte. Außerdem befindet sich noch ein Teil des benachbarten Gens *gas41* (Chong 2002) abwärts des Lysozym-Gens. Es handelt sich dabei um 81 bp am Ende des offenen Leserahmens, die jedoch keinerlei bekannte regulatorische Sequenzen beinhalten. Dies kann dadurch erklärt werden, dass in pPolyIII-I-Lys (siehe

Abb. 17) ein unvollständiger NarI-Verdau stattfand oder die bei 15111 bp angegebene NarI-Restriktionsschnittstelle nicht existiert.

Für die Transfektion wurde pLys-8.8 mit NotI geschnitten. Es entstanden zwei lineare DNA-Stücke von 2000 bp und 17764 bp Länge (Abb. 31). Davon enthält das größere der beiden die gewünschte lac-Operator Sequenz und das Lysozym-Transgen. In einer Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von T. Schroeder (GSF, Neuherberg), wurde von H. Eilken mittels Elektroporation (siehe 2.2.3) eine Cotransfektion mit einem Reporterplasmid durchgeführt und anschließend circa 50 Klone gepickt. Diese wurden in Wellplatten hochgezogen und mittels PCR auf die Integration von pLys-8.8 überprüft (Methode und Primer siehe 2.2.5).

Von den so getesteten ES-Klonen konnte lediglich aus einem das Operatorplasmid pLys-8.8 isoliert werden (Abb. 32). Dieses wurde außerdem nur zum Teil integriert. Mittels spezieller Primer (siehe 2.2.5) konnte eine Region des Plasmids bei ca. 9000 bp nachgewiesen werden. Dies gelang jedoch nicht für das stromabwärts gelegene Ende des Lysozyngens bei ca. 14700 bp und einen weiteren Bereich bei ca. 3000 bp (siehe Abb. 30). Hier ist ein Teil des Plasmids verloren gegangen.

Abb. 31 (links):

Spur 1: 1 µg des unverdauten Plasmids pLys-8.8. **Spur 2:** Vollständiger Verdau von pLys-8.8 mit NotI führt zu zwei DNA-Fragmenten. Eines davon (2000 bp) enthält lediglich backbone-DNA, das andere (17764 bp) das zu transfizierende Lysozym-Transgen inklusive der regulatorischen Sequenzen und der lac-Operator Wiederholungseinheit.

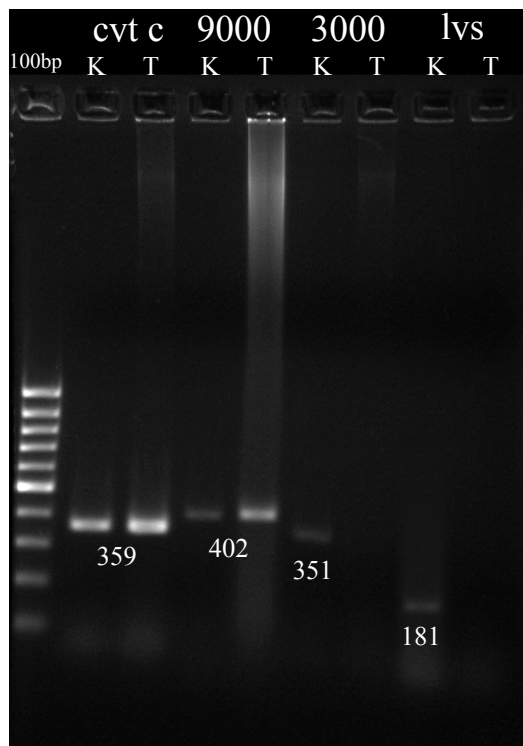
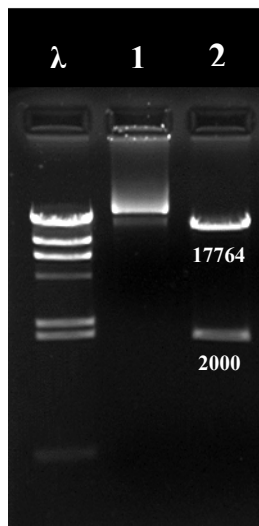


Abb. 32 (rechts):

PCR eines mit pLys-8.8 transfizierten ES-Klons (T) im Vergleich zu einem mit pPolyIII-I-Lys transfizierten ES-Klon als Kontrolle (K). pPolyIII-I-Lys enthält das für die Klonierung von pLys-8.8 verwendete Lysozym-Transgen inklusive regulatorischer Sequenzen. Zur Kontrolle der vollständigen Transfektion mit pLys-8.8 wurden drei verschiedene Primerpaare verwendet (3000 und lvs). (T) und (K) zeigen ein positives Ergebnis für die Cytochrom c - Kontrolle, sowie für einen Teil des Plasmidbackbones bei ca. 9000 bp. Ein weiter stromaufwärts gelegener Teil des Plasmids bei ca. 3000 bp und zumindest das stromabwärts gelegene Ende des Lysozym-Gens sind in (T) verloren gegangen.

3.1.2 Transfektion muriner ES-Zellen

Mit Hilfe umfangreicher Versuchsreihen sollten embryonale Maus-Stammzellen mit dem lac-Operator/lac-Repressor System etabliert werden. Mittels Elektroporation, Calcium-Phosphat-Präzipitation und dem Lipid-basierten Transfektionsreagenz FuGENE (siehe Transfektionsmethoden 2.2.3) wurde in über 20 experimentellen Ansätzen und anschließendem Picken von insgesamt mehreren hundert Klonen versucht, die beiden Plasmide in das Genom der ES-Zellen zu integrieren. Eine einzelne Versuchsreihe, vom Aussäen der Zellen bis zum Überprüfen auf Plasmidintegration mittels PCR, nahm dabei bis zu vier Wochen in Anspruch. Es wurden sowohl Cotransfektionen von Repressor und Operator, als auch aufeinander folgende Einzeltransfektionen der beiden Plasmide durchgeführt. Als lac-Repressor Konstrukt wurde p3'SS-EGFP oder -YFP (Abb. 15), als Operator wahlweise pPS-8.8 (Abb. 16, links) oder pPALZ8.8 (Abb. 16, rechts) verwendet.

Obwohl es in der Arbeitsgruppe zunächst mittels Cotransfektion von lac-Repressor und lac-Operator gelang, Zellen mit punktförmigen Signalen zu erzeugen ((Mayer 2006); siehe Abb. 65), war es nicht möglich, die gewünschten stabilen Zellen zu etablieren. Nach Subklonierungen wurden nur in sehr wenigen Zellen Signale gefunden. Auch weitere Subklonierungsschritte brachten keinen Erfolg und der Anteil der Zellen mit Signalpunkten konnte nicht erhöht werden.

Daher wurde versucht, die beiden Plasmide nacheinander, in aufeinander folgenden Einzeltransfektionen zu integrieren. Jedoch konnte auch auf diese Weise keine stabile Expression des GFP-lac-Repressors erzielt werden. In ungefähr einem Drittel der Klone konnte mittels spezifischer PCR die Aufnahme des jeweiligen Plasmids in die Zellen eindeutig nachgewiesen werden (siehe 2.2.5 und Abb. 21). Manche Zellen eines Klons zeigten nach der Transfektion mit dem GFP-lac-Repressor die erwartete grüne Färbung des Zellkerns, welche jedoch durch Subklonierung nicht etabliert werden konnte (Abb. 33). Genau wie nach der Cotransfektion, ging bereits nach wenigen Passagen das Signal verloren und die Zellen schienen außerdem ihre Pluripotenz zu verlieren. Dies zeigte sich an einem teilweise negativen Oct3/4-Antikörperrnachweis und an einer veränderten Zellmorphologie (Abb. 34). Häufiges Subklonieren führte zum spontanen Ausdifferenzieren einiger ES-Zellen.

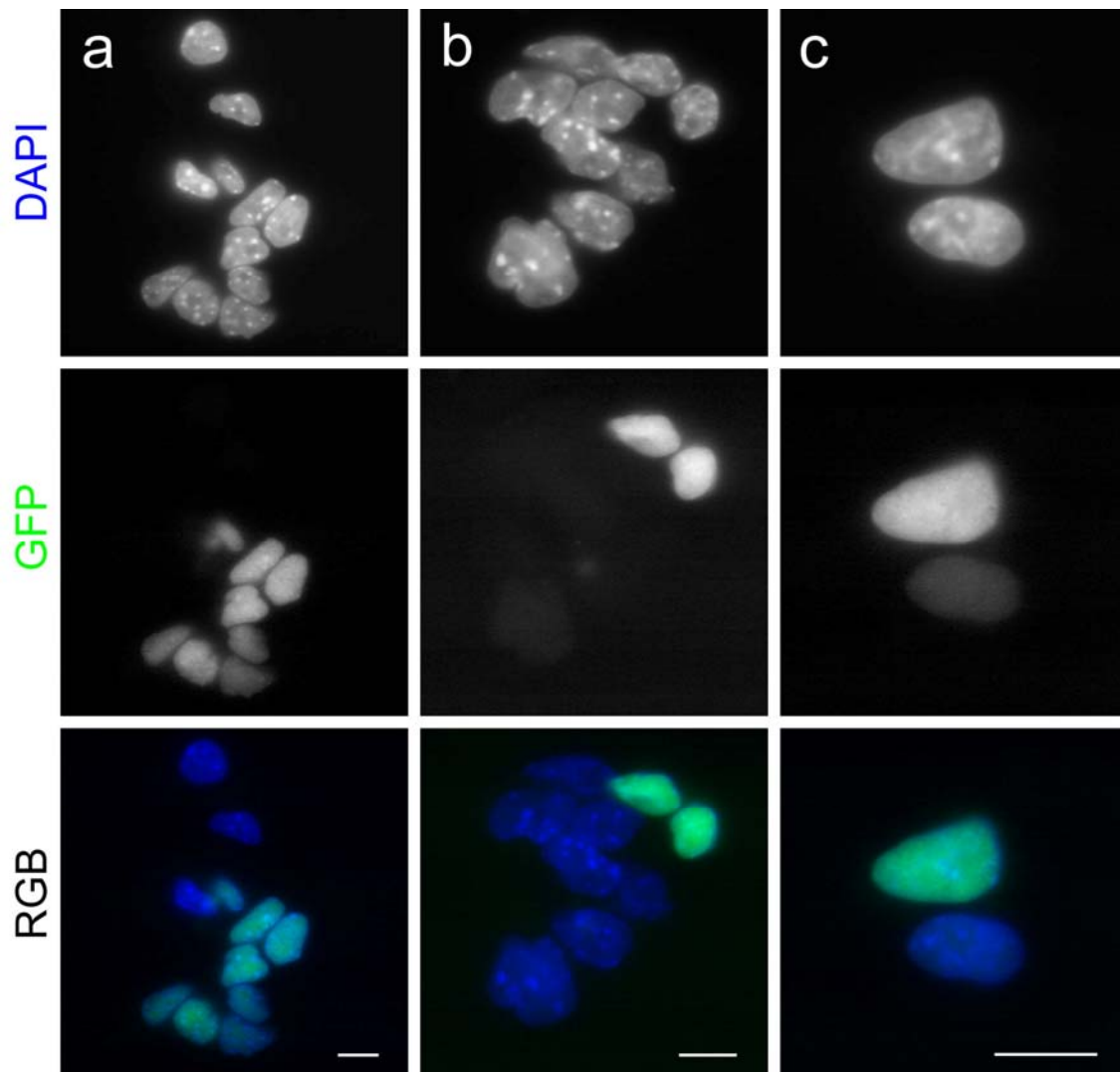


Abb. 33: Transfektion von mES-Zellen mit dem lac-Repressor p3'SS-EGFP: Einige Tage nach der Transfektion zeigen viele Zellen die gewünschte grüne Färbung (a), deren Anteil bei anschließendem Passagieren nach und nach kleiner wird (b). Die transfizierten Zellen können durch Subklonierung nicht etabliert werden. Sogar Tochterzellen zeigen häufig eine unterschiedliche GFP-Färbung (c), die bereits nach wenigen Passagen größtenteils erneut verloren geht. Maßstab: 10 μ m.

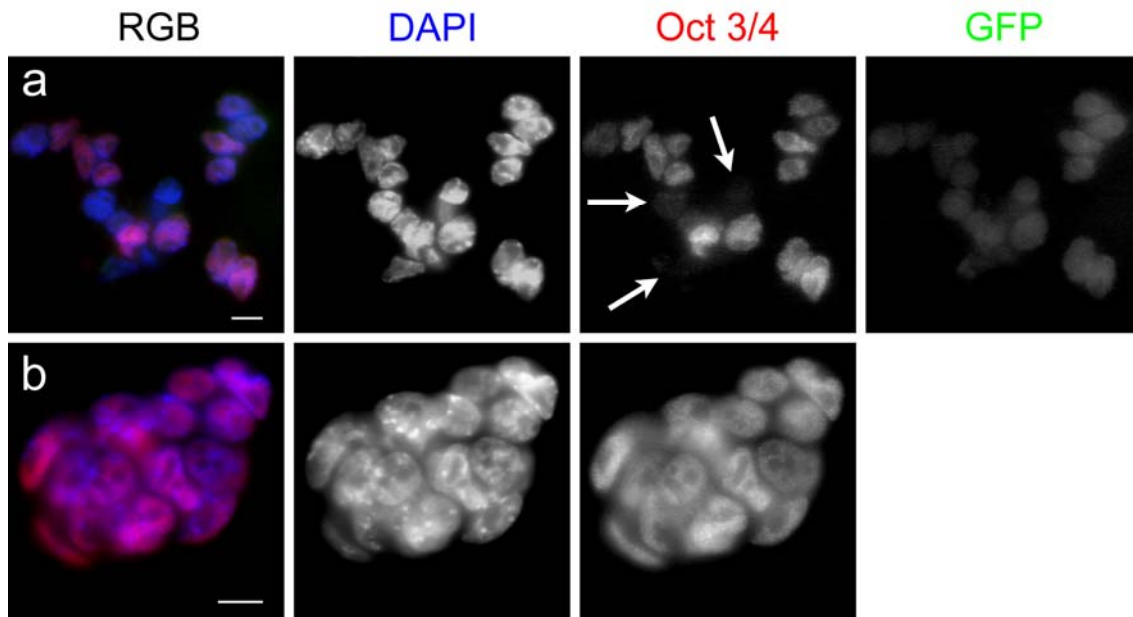


Abb. 34: mES-Zellen verlieren wenige Passagen nach der Transfektion mit dem GFP-lac-Repressor ihre Pluripotenz (a), da einige Zellen nur noch eine schwache oder gar keine Oct3/4-Färbung (siehe Pfeile) mehr aufweisen und im Vergleich zu untransfizierten mES-Zellen (b) zusätzlich eine veränderte Zellkernmorphologie besitzen. Maßstab: 10 μ m.

3.2 Konservierung der dreidimensionalen Chromatinstruktur in FISH-Experimenten

Als Grundlage für die geplanten 3D-FISH Experimente, wurden anhand von mES-Zellen zwei gängige Fixierungsmethoden für FISH auf Interphasekernen getestet und miteinander verglichen: Fixierung ausgesäter Zellen mit 4% Paraformaldehyd (PFA) und anschließender Permeabilisierung (Methode, siehe 2.3.6), sowie hypotone Behandlung gefolgt von Methanoleisessig Fixierung (Hypo-MAA), Auftropfen und Lufttrocknen der Zellen (Methode siehe 2.3.5). Das Protokoll für letztere Methode wurde freundlicherweise von W. Bickmore (Edinburgh, UK) zur Verfügung gestellt. Es wurde und wird in einer Reihe von Arbeiten zur Beurteilung der dreidimensionalen DNA-Anordnung angewandt (siehe 1.3).

3.2.1 Konservierung der Kernform

Lebende mES-Zellen besitzen nach Vereinzelung mehr oder weniger kugelförmige Zellkerne mit einem mittleren Durchmesser von ca. 11 μ m (Mayer 2005). Im Vergleich zur Fixierung mit PFA, führte die hypotone Behandlung trypsinierter Zellen mit anschließendem Auftropfen und Lufttrocknen in den hier durchgeführten Experimenten zu stark abgeflachten Zellkernen in xy-Richtung mit weniger als der halben Höhe. Gleichzeitig nahm die Breite dieser Kerne zu. Die Kerndurchmesser variierten dabei stark und konnten einen mehr als doppelt so hohen Wert annehmen (siehe Abb. 35). Derselbe Effekt wurde auch für MEL-Zellen beschrieben (Otten 2004; Hepperger 2007). Dabei stellte sich heraus, dass dies eine Folge der hypotonen Behandlung und des darauffolgenden Auftropfens ist und nicht der Fixierung mit Methanoleisessig per se. In diesen Arbeiten konnte auch gezeigt werden, dass sich die Kernform bei beiden Fixierungsmethoden durch die anschließende FISH nur wenig verändert.

3.2.2 Konservierung der Chromozentrenstruktur

Eine charakteristische Eigenschaft von Zellkernen der Maus ist das Clustern perizentrischer Regionen zu sogenannten Chromozentren (Mayer 2005). In strukturell konservierten Mauseukaryoten können Chromozentren mit AT-spezifischen DNA-Gegenfärbungen wie DAPI oder TO-PRO-3 sichtbar gemacht werden. Dementsprechend erschienen Chromozentren in PFA-fixierten Nuklei als distinkte, klar abgegrenzte Strukturen, deren Signalstärke sich deutlich vom Rest des Kerns abhob. Dagegen variierte in Methanoleisessig fixierten Zellen die Struktur des Heterochromatins stark. In manchen schien die Struktur der Chromozentren relativ normal, während die meisten Kerne eine homogenere Färbung zeigten, mit diffusen Bereichen stärkerer Signalintensität. Die Chromozentren grenzten sich dabei weniger deutlich ab (Abb. 35). Veränderungen der Chromozentrenstruktur aufgrund von Fixierungen nach hypotoner Behandlung mit Methanoleisessig wurden auch in MEL-Zellen beobachtet und mittels quantitativer Auswertung dreidimensionaler Bildstapel (Object Counting) bestätigt (Hepperger 2007).

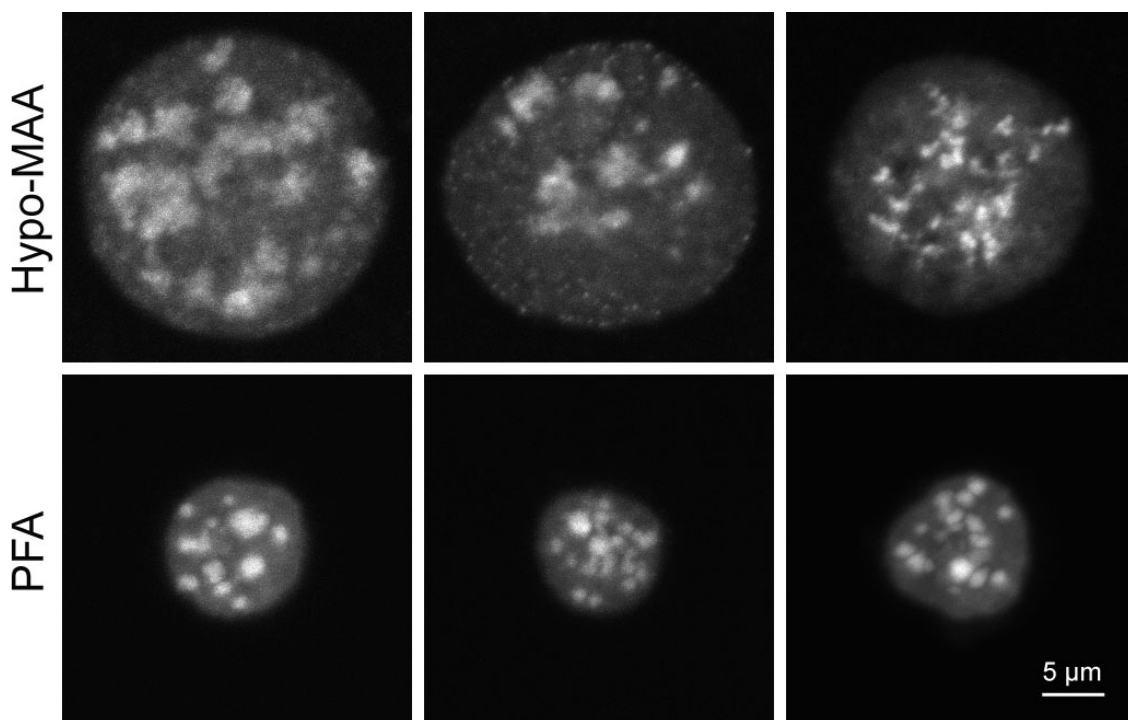


Abb. 35: Projektionen von 3D-Bildstapeln TOP-RO-3 gefärbter Nuklei embryonaler Mausstammzellen nach zwei verschiedenen Fixierungsmethoden (gleicher Maßstab in allen Abbildungen). Die Art der Fixierung spiegelt sich sowohl in der Kernform und -größe als auch in der Struktur der Chromozentren wider: Im Vergleich zu PFA (Paraformaldehyd) - fixierten Kernen sind Hypo-MAA (methanol acetic acid) - fixierte Kerne abgeflacht (nicht gezeigt) und besitzen ca. doppelten Durchmesser. Die Chromozentren PFA-fixierter Kerne sind klar abgegrenzt, während sie in Hypo-MAA-Kernen meist wesentlich diffuser erscheinen (oben links und Mitte). In einigen wenigen Fällen zerfallen sie sogar vollständig (oben rechts). Wodurch ein solch fragmentiertes Muster zustande kommt, ist nicht geklärt. Möglicherweise befanden sich die entsprechenden Zellen gerade in der Mitose oder gar Apoptose.

3.2.3 Konservierung der Struktur und Position von Chromosomenterritorien und Genen

Mittels FISH markierte, chromosomale Regionen in PFA- und Hypo-MAA-fixierten Kernen wurden untersucht und verglichen. Als FISH-Sonde diente Maus-Chromosom 7 (MMU7) und der am telomerischen Ende des q-Arms positionierte, knapp 200 bp große BAC RP23-6I17 (siehe 2.3.1). Dieser beinhaltet das Gen *Phlda2* (= *Tssc3*) und einen Teil von *Osbp15* (= *Obph1*; www.ensembl.org) und liegt in einem Bereich, welcher mit dem Beckwith-Wiedemann-Syndrom (BWS) assoziiert ist. Der vergleichbare BAC 245N5 einer früheren Studie beinhaltet zusätzliche Sequenzen am zentromerischen Ende. Diese genreiche Region auf MMU7F5 wurde am Rand des MMU7-Territoriums in Hypo-MAA-fixierten mES-Zellen gefunden (Mahy 2002a).

Vergleicht man Bilder der beiden Fixierungen, so unterscheiden sich die Zellkerne nicht nur in ihrer Form, sondern auch deutlich anhand ihrer Chromosomenterritorien (Abb. 36). Die Territorien in PFA-fixierten Kernen sind kompakt und deutlich abgegrenzt, während sie in Hypo-MAA-fixierten Kernen ausgefranst und unregelmäßig erscheinen. Die Struktur gleicht hier einem Schwamm mit vielen Löchern und Einbuchtungen.

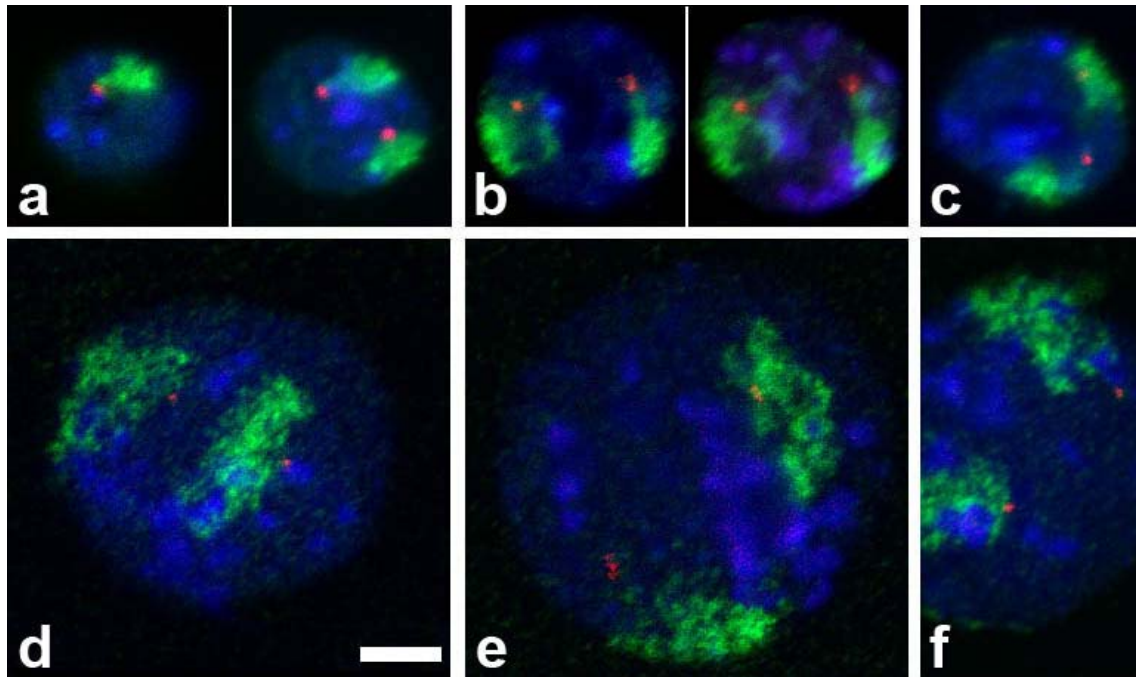


Abb. 36: Zweifarben-FISH auf mES-Zellen mit MMU7 in grün, einem BAC für die BWS-Region in rot (Lage des BACs, siehe Abb. 22) und DAPI-Gegenfärbung in blau. Die Territorien in Paraformaldehyd-fixierten Zellen (a-c) wirken im Vergleich zu Methanoleisessig-fixierten Zellen mit vorangegangener hypotoner Behandlung (d-f) kompakter und gleichmäßiger strukturiert, der Kerndurchmesser ist viel geringer (siehe auch Abb. 35) und die BAC-Signale stehen mit den Chromosomenterritorien in Verbindung. Für die Kerne in a und b sind einzelne konfokale Schnitte (links) und eine Projektion des Bildstapels (rechts) gezeigt. Bei c-f handelt es sich um einzelne konfokale Schnitte. Maßstab: 5µm.

Der Eindruck bezüglich struktureller Unterschiede in den Chromosomenterritorien wurde bestätigt, indem die Zahl unabhängiger Objekte, die durch steigenden Schwellenwert entstehen, quantitativ gemessen wurde (Object Counting, siehe 2.7.5; Ergebnisdateien s. beigelegte CD).

Bei entsprechenden Schwellenwerten bildeten die beiden homologen Territorien in PFA-fixierten Kernen zwei bis drei Objekte, während es in Hypo-MAA-fixierten Kernen sechs oder mehr waren (Abb. 37 links, $p < 0,001$). Dies bestätigte den visuellen Eindruck einer kompakteren Struktur in PFA-fixierten Kernen. Bei den FISH-Signalen der BAC-Sonde gab es dagegen keine nennenswerten Unterschiede (Abb. 37 rechts).

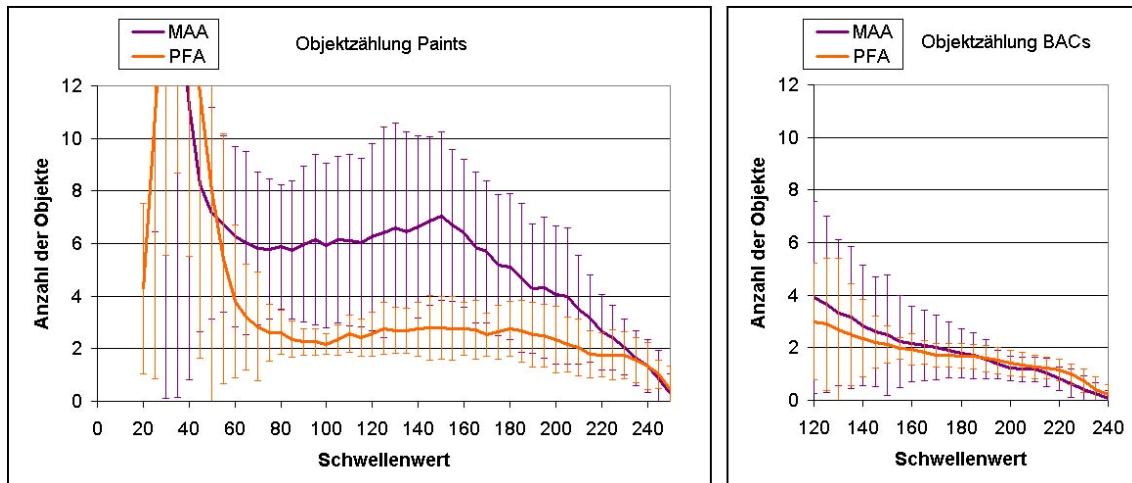


Abb. 37: Object Counting zeigt den Zerfall der Chromosomenterritorien (links) in Hypo-MAA-fixierten Zellen ($n = 33$), verglichen mit PFA-fixierten Zellen ($n = 39$). Schwellenwerte unter 80 sind durch den Kernhintergrund beeinflusst. Von 80 bis 200 zeigen die Territorien in PFA-fixierten Kernen eine Auftrennung in ca. zwei Objekte, eines für jedes Territorium. In Hypo-MAA-fixierten Kernen hingegen existieren ca. sechs Objekte. Die Varianz ist ebenfalls wesentlich größer, was durch die Fehlerbalken (Standardabweichung) verdeutlicht wird. Die kleinen BAC-Signale (rechts) sind bei beiden Fixierungen ähnlich kompakt. Hier existieren keine auffälligen Strukturunterschiede.

Des Weiteren wurden die absoluten Abstände der BAC-Signale zur Oberfläche ihrer Chromosomenterritorien gemessen (Abb. 38a,b; Methode siehe 2.7.3). Nach beiden Fixierungsmethoden befanden sich die BAC-Signale im Durchschnitt näher an der Oberfläche ihrer Territorien als der Großteil des Territoriensignals selbst ($p < 0,001$). Allerdings wurden in Hypo-MAA-fixierten Nuklei 31% der Signalintensität des BACs außerhalb der Territorien gefunden, während es in PFA-fixierten lediglich 16% waren. Nach Intensität gewichtete, mittlere Abstände der Territoriensignale zur Territorienoberfläche waren in Hypo-MAA-fixierten Zellen signifikant kleiner als in PFA-fixierten Zellen ($p < 0,001$).

Die Messung absoluter Abstände der FISH-Signale und der Kerngegenfärbung zur Oberfläche des Nukleus (Abb. 38c,d) bestätigte das Abflachen der Hypo-MAA-fixierten Kerne. Während die DNA hier maximal $2,5 \mu\text{m}$ von der Kernoberfläche entfernt war, wurden in PFA-fixierten Kernen Abstände von mehr als $4 \mu\text{m}$ zur Oberfläche erreicht ($p < 0,001$). Des Weiteren wurden in PFA-fixierten Kernen keine BAC-Signale und lediglich 1,6% der Territoriensignale außerhalb des segmentierten Nukleus gefunden, während es in Hypo-MAA-fixierten Kernen 2,2% der BAC- und 5,9% der Territorien-Signale waren. Dies spricht für eine artifizielle Verlagerung der Strukturen. Bei beiden Fixierungsmethoden lagen die BAC-Signale durchschnittlich weiter im Kerninneren als die Territoriensignale ($p < 0,001$), was für eine gewisse Stabilität der radialen Verteilung gegenüber Fixierungsartefakten spricht. Die Ergebnisse in Form von absoluten Abständen wurden durch Messungen der relativen radialen Verteilung (3D-RRD, siehe 2.7.2) bestätigt (Abb. 38e,f).

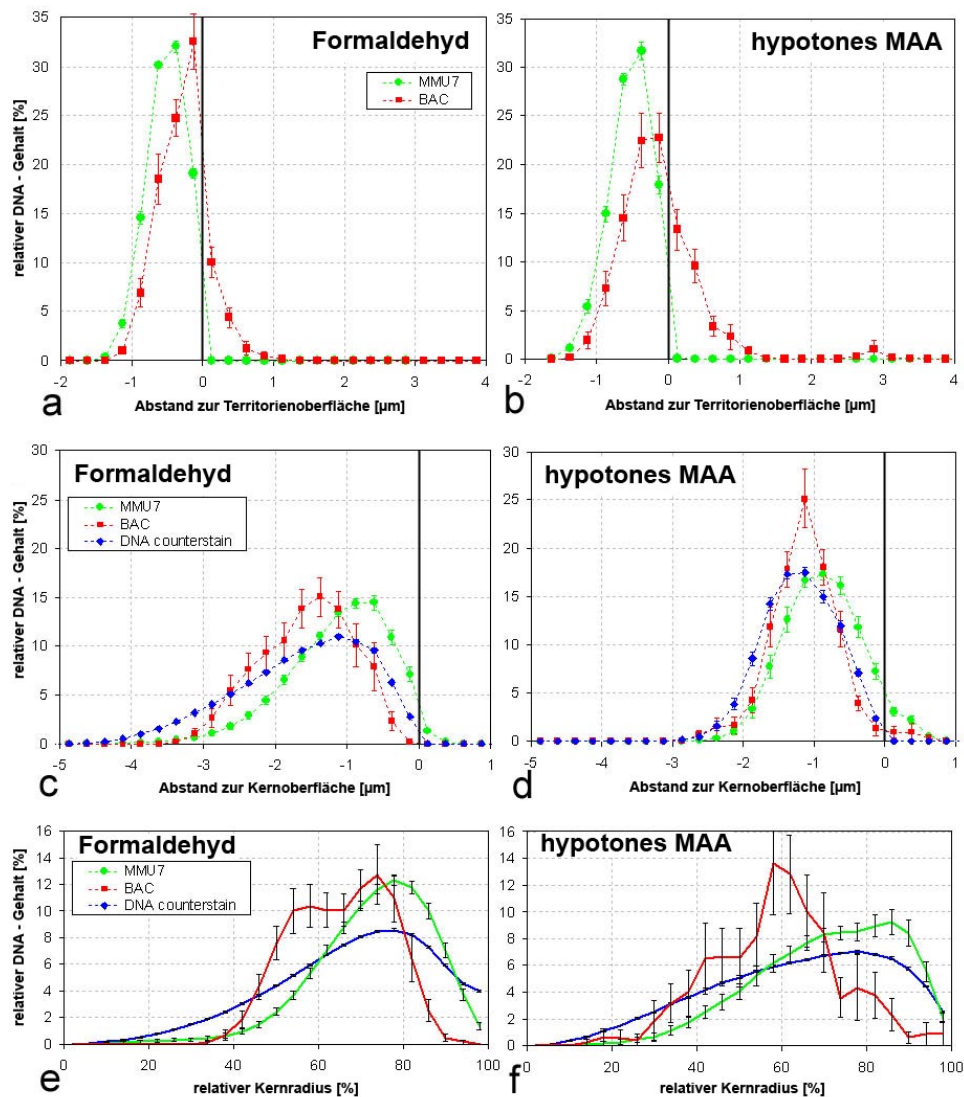


Abb. 38: Quantitative Verteilung von FISH-Signalen in unterschiedlich fixierten mES-Zellen. Absolute Abstände zur Oberfläche segmentierter Chromosomenterritorien (a, b) und dem Zellkern (c, d) in PFA- (a, c) und Hypo-MAA-fixierten (b, d) Präparaten. Die Voxel eines jeden Signals wurden dabei Schalen gleicher Dicke (0,25 μm) zugeordnet. Jeder Punkt repräsentiert den durchschnittlichen, relativen Signalanteil einer solchen Schale. Signale mit negativen Abstandswerten befinden sich innerhalb der Referenzstruktur, positive außerhalb (EDMT, siehe 2.7.3). e, f) Relative radiale Verteilung von FISH-Signalen und DNA-Gegenfärbung in PFA- (e) und Hypo-MAA- (f) fixierten Kernen. Bei dieser Methode wird jedes Voxel des Kernvolumens einer von 25 gleich dicken Schalen zugeordnet (3D-RRD, siehe 2.7.2). Die Verteilung der DNA-Gegenfärbung in PFA-fixierten Zellen unterscheidet sich signifikant ($p < 0,001$) von der in Hypo-MAA-fixierten Zellen. Diese ähnelt eher der Verteilung in strukturell konservierten, PFA-fixierten Fibroblasten mit flacheren Zellkernen (Mayer 2005). Dabei befindet sich weniger DNA in den äußeren und mehr in den inneren Schalen. Verglichen mit den zugehörigen Territorien, liegen die BAC-Signale beider Fixierungen weiter im Kerninneren ($p < 0,001$ bei PFA, $p < 0,005$ bei Hypo-MAA). In diese Auswertung wurden nur Zellkerne mit getrennten Territorien aufgenommen, um BAC-Signale eindeutig zuzuordnen zu können. Dadurch sind Kerne ausgeschlossen, bei denen sich beide Territorien im Kernzentrum befinden, was tendentiell in einer eher externen Position resultiert. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung des Mittelwerts.

3.3 Dreidimensionale Genpositionierung in Mauszellkernen

In diesem Teil der Arbeit wurde die räumliche Verteilung von acht Genloci auf vier verschiedenen Chromosomen in Mauszellen untersucht. Dazu wurden entsprechende Sonden auf PFA-fixierte mES-Zellen und in vitro differenzierte Maus-Makrophagen hybridisiert und mittels 3D-FISH nachgewiesen (Abb. 39; RGB-Projektionen aller Kerne siehe beigelegte CD). Bei den verwendeten Genloci kann zwischen Gendichte und GC-Gehalt, sowie anderen Faktoren, welche die Positionierung endogener Loci im Nukleus beeinflussen können, unterschieden werden (siehe Tabelle 10 und Abb. 46).

Bei den untersuchten Genloci handelt es sich um je zwei BACs auf drei verschiedenen Chromosomen (siehe 2.3.1; Abb. 22): der β -Actin und Albumin-Locus auf *Mus musculus* Chromosom 5 (MMU5); MMU7 mit β -Globin und CD11b; sowie MMU10 mit Myb und Lysozym. In drei weiteren Experimenten wurde der Oct3/4-Locus auf MMU17, der Myeloperoxidase (Mpo) Locus auf MMU11 und ein zur humanen Beckwith-Wiedemann-Syndrom (BWS) Region homologer Bereich auf MMU7 untersucht (siehe 3.2.3). Im Falle des β -Actin und Albumin-Locus wurden neben den ES-Zellen und Makrophagen auch Myoblasten der Linie PMI28 in die Untersuchung eingeschlossen.

Der β -Actin- und der Albumin-Locus auf MMU 5 wurde dabei im Rahmen einer Diplomarbeit von A. Mannes untersucht und entsprechende Bilder aufgenommen. Die FISH-Experimente bezüglich des Mpo-Locus auf MMU 11 wurden im Rahmen eines Laborpraktikums von J. Merz durchgeführt. Die quantitative Auswertung aller Daten erfolgte jedoch im Rahmen dieser Dissertation, um die Einheitlichkeit bei der Bearbeitung zu gewährleisten.

Insgesamt wurden mehr als 400 Zellkerne mit dem konfokalen LSM dreidimensional aufgenommen und ausgewertet. Für alle FISH-Signale wurden die radialen Abstände zum Kernrand und im Falle der Genloci auch zur Oberfläche der entsprechenden Chromosomenterritorien gemessen. Die radiale Auswertung bezüglich der Kernoberfläche erfolgte mittels zweier verschiedener Methoden: EDMT (Abb. 40 und Abb. 41; Methode siehe 2.7.3) und RRD (Abb. 43; Methode siehe 2.7.2). Die Ergebnisdateien aller Berechnungen befinden sich auf der beigelegten CD. Im Falle von EDMT wurde zum Vergleich die Berechnung mit normalisierten Zellkernen wiederholt (Abb. 42). Dafür wurde die Größe der Kerne bzw. deren maximaler Durchmesser normiert. Für ein Experiment (Oct3/4-Locus) wurde zusätzlich eine BrdU-Färbung durchgeführt und BrdU-positive im Vergleich zu BrdU-negativen Nuklei aufgenommen. Deren Signale wurden anschließend miteinander verglichen, um etwaige Einflüsse des Zellzyklus auf die Position im Kern auszuschließen (Abb. 44).

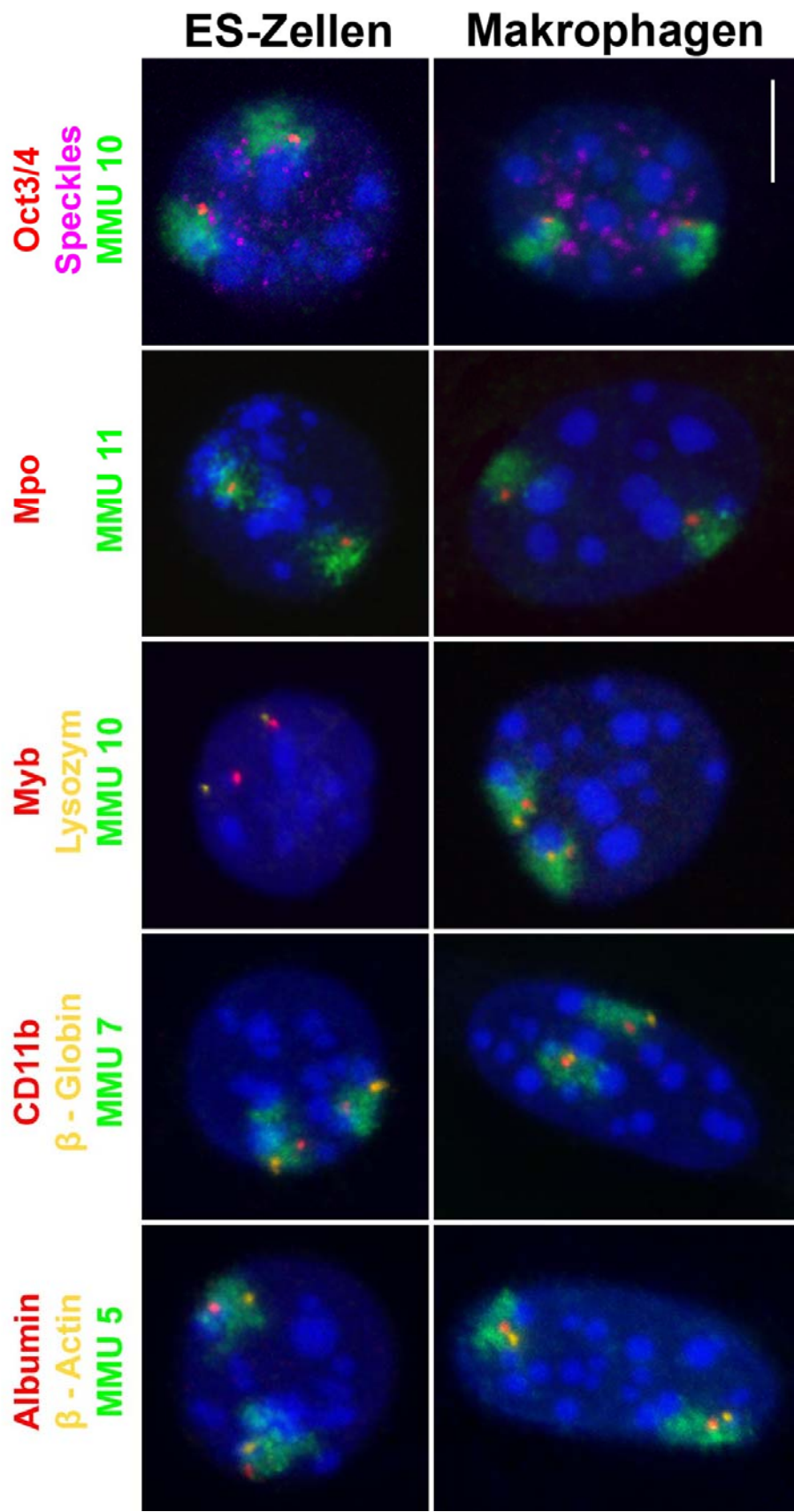


Abb. 39: Darstellung der verschiedenen 3D-FISH Experimente auf strukturell konservierten ES- und Makrophagen-Zellkernen (2D-FISH, siehe Abb. 24). Chromosomenterritorien sind grün, BACs rot und gelb und die DNA Gegenfärbung blau dargestellt. Mit dem Antikörper α -SF2/ASF (siehe 2.3.11) wurden Splicing Speckles (pink) nachgewiesen. Bei den Abbildungen handelt es sich um RGB-Projektionen konfokaler Bildstapel. Die beiden Abbildungen von Albumin/ β -Actin auf MMU5 wurden von A. Mannes im Rahmen einer Diplomarbeit angefertigt. Maßstab: 5 μ m.

3.3.1 Anordnung von Genloci und Chromosomenterritorien innerhalb des Zellkerns

In den meisten Fällen unterscheiden sich die Abstände der Genloci und der zugehörigen Chromosomenterritorien zur Kernoberfläche signifikant voneinander (Abb. 40 und Tabelle 6). Zum Beispiel liegt der β -Globin-Locus in ES-Zellen signifikant weiter außen im Kern als das entsprechende Chromosom 7 (Abb. 40c). Auffällig ist hierbei die bevorzugte Positionierung des β -Globin-Locus am Kernrand. Drei Viertel seiner Signalintensität liegen lediglich bis zu 0,75 μ m vom Kernrand entfernt. Die visuelle Überprüfung bestätigt, dass der Locus häufig in peripheres Heterochromatin eingebettet ist (Abb. 39). Im Gegensatz dazu liegt der CD11b-Locus des gleichen Chromosoms viel weiter innen als der β -Globin-Locus und das Territorium selbst. Dies zeigt, dass sich zwei Genloci auf demselben Chromosom in ihrer bevorzugten radialen Anordnung unterscheiden können (alle drei p-Werte < 0,001). Bezüglich der Assoziation dieser beiden Loci zu zentromerischem Heterochromatin konnten keine Unterschiede in ES-Zellen und Makrophagen gefunden werden. In Mauszellen ist diese Art von Heterochromatin leicht anhand der hellen DAPI-Färbung der Chromozentren zu erkennen. Von 70 Allelen in 35 untersuchten Makrophagen-Nuklei, berühren 10 ein Chromozentrum, verglichen mit 8 von 70 CD11b-Allelen, die ein für diese Zellen typisches Oberflächenantigen exprimieren (nachgewiesen durch Antikörperfärbung, siehe 2.1.8). In ES-Zellen berühren beide Loci in 8 von 70 Fällen zentromerisches Heterochromatin. Folglich ist der nicht-exprimierte β -Globin-Locus in Mauszellen vorzugsweise an der Kernperipherie lokalisiert, jedoch nicht mit zentromerischem Heterochromatin assoziiert.

Zelltyp und Genloci	Gen1 – Gen2	Gen1 - Terr	Gen2 - Terr	Gen1 - DNA	Gen2 - DNA	Terr - DNA
ES: Act / Alb	< 0,001	0,112	< 0,001	0,047	< 0,001	< 0,001
ES: β -Glob / CD11b	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	0,021	< 0,001
ES: Lys / Myb	0,006	-	-	0,037	0,26	-
ES: Mpo	-	0,066	-	0,008	-	< 0,001
ES: BWS	-	< 0,001	-	0,65	-	< 0,001
ES: Oct3/4	-	< 0,001	-	0,161	-	< 0,001
diff. ES: Oct3/4	-	< 0,001	-	0,167	-	0,001
Mak: Act / Alb	< 0,001	< 0,001	0,107	0,55	< 0,001	< 0,001
Mak: β -Glob/ CD11b	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001	< 0,001
Mak: Lys / Myb	< 0,001	0,952	< 0,001	< 0,001	0,962	< 0,001
Mak: Mpo	-	< 0,001	-	0,342	-	< 0,001
Mak: Oct3/4	-	< 0,001	-	0,003	-	0,001
Myobl.: Act/Alb	0,01	0,003	0,817	0,425	< 0,001	< 0,001

Tabelle 6: Statistischer Vergleich der absoluten Abstände zur Kernoberfläche. Mit dem Wilcoxon-Signed-Rank-Test wurden p-Werte für alle Vergleiche innerhalb einer Kernpopulation berechnet. Der Test basiert auf einem paarweisen Vergleich der mittleren Signalpositionen in jedem Kern.

Signifikante Unterschiede in der radialen Verteilung treten zwischen allen untersuchten Genlocipartnern eines Zelltyps auf, sowie in den meisten Fällen zwischen einem Locus und dem zugehörigen Territorium (Tabelle 6): In ES-Zellen bei Albumin (Abb. 40a) und Oct3/4 (Abb. 40i), sowie der BWS-Region (Abb. 38e); in Makrophagen bei Actin (Abb. 40b), β -Globin, CD11b (Abb. 40d), Mpo (Abb. 40h) und Oct3/4 (Abb. 40j), sowie in Myoblasten für das Actin-Gen (Abb. 40l). Jedoch ist die radiale Position nicht deterministisch. Alle untersuchten Chromosomenterritorien und die meisten Genloci wurden sowohl am Kernrand gefunden, als auch bis zu 3 μm in ES-Zellen und bis zu 2 μm in Makrophagen vom Kernrand entfernt. Ausnahmen sind die BWS-homologe Region in ES-Zellen (Abb. 38e), der CD11b-Locus in Makrophagen (Abb. 40d) und das Oct3/4-Gen in beiden Zelltypen (Abb. 40i, j), welche nicht in den äußeren 0,25 μm des gegengefärbten Nukleus zu finden waren.

3.3.2 Anordnung von Genloci innerhalb des Chromosomenterritoriums

Um die Position von Genloci bezüglich ihres Chromosomenterritoriums zu untersuchen, wurde der Abstand eines jeden Genlocus- und des zugehörigen Territorien-Signals zur Oberfläche des Territoriums gemessen (Abb. 41) und verglichen.

Die meisten Genlocus-Signale befinden sich in beiden Zelltypen eindeutig innerhalb der zugehörigen Chromosomenterritorien. Jedoch wurden für jeden Locus auch Signale gefunden, welche teilweise oder vollständig außerhalb des segmentierten Territoriums liegen. Der außerhalb liegende Signalanteil beträgt jeweils ca. 10%, wobei die Entfernung der Signale zum Territorium 0,5 μm nicht überschreitet.

Beispielsweise liegen in ES-Zellen und Makrophagen 85% des Oct3/4-Genlocus-Signals innerhalb der segmentierten Grenzen des Chromosomenterritoriums, obwohl sich die Form der MMU17-Territorien in den beiden Zelltypen unterscheidet. In Makrophagen befindet sich ein größerer Anteil des MMU17 näher an der Oberfläche (Abb. 41i, j). Sowohl die flachere Kernform als auch mehr Einstülpungen am Territorienrand können Grund dafür sein. Oct3/4 ist ein speziell in Stammzellen exprimierter Transkriptionsfaktor, auch bekannt als Pou5f1, der kurz nach Differenzierungsbeginn dauerhaft abgeschaltet wird (Übersicht s. Koestenbauer 2006). Im Vergleich dazu konnte in der Verteilung des CD11b- und β -Globin-Locus ein leichter Unterschied festgestellt werden. Der nicht transkribierte β -Globin-Locus (siehe RT-PCR, Abb. 47) befindet sich näher an der Peripherie des Territoriums als der exprimierte CD11b-Locus (Abb. 41c), auch wenn dieser Unterschied nicht signifikant ist. Die Positionierung des β -Globin-Locus an der Oberfläche des Territoriums könnte dabei eine Folge der starken Bindung des Locus an den Kernrand sein (siehe 3.3.1).

Im Allgemeinen zeigen die Signale simultan detektierter Loci eine dem Territorium sehr ähnliche Verteilung der Abstände zur Territorienoberfläche (Abb. 41a-l; Tabelle 7). Dies schließt auch die Fälle ein, in denen signifikante Unterschiede in der radialen Verteilung im Zellkern festgestellt wurden, wie z.B. bei dem Locuspaar Myb und Lys (vergleiche Abb. 40e,f mit Abb. 41e,f). Somit sind zwar die Abstände dieser Loci zur Kernoberfläche signifikant unterschiedlich, nicht jedoch ihre Abstände zur Oberfläche des Territoriums.

Zelltyp und Genloci	Gen1 – Gen2	Gen1 - Terr	Gen2 - Terr
ES: Act / Alb	0,287	0,026	0,395
ES: β -Glob / CD11b	0,377	< 0,001	< 0,001
ES: Lys / Myb	0,867	0,201	0,03
ES: Mpo	-	0,963	-
ES: BWS	-	< 0,001	-
ES: Oct3/4	-	< 0,001	-
diff. ES: Oct3/4	-	0,008	-
Mak: Act / Alb	< 0,001	< 0,001	0,065
Mak: β -Glob/ CD11b	0,087	0,025	< 0,001
Mak: Lys / Myb	0,99	0,152	0,341
Mak: Mpo	-	0,939	-
Mak: Oct3/4	-	0,007	-

Tabelle 7:
p-Werte des Wilcoxon-Signed-Rank-Test auf Ungleichheit der Positionierung von Genen bezüglich ihrer Chromosomenterritorien. Die Werte wurden für alle Vergleiche innerhalb einer Kernpopulation berechnet und basieren auf einem paarweisen Vergleich der mittleren Signalposition in jedem Nukleus.

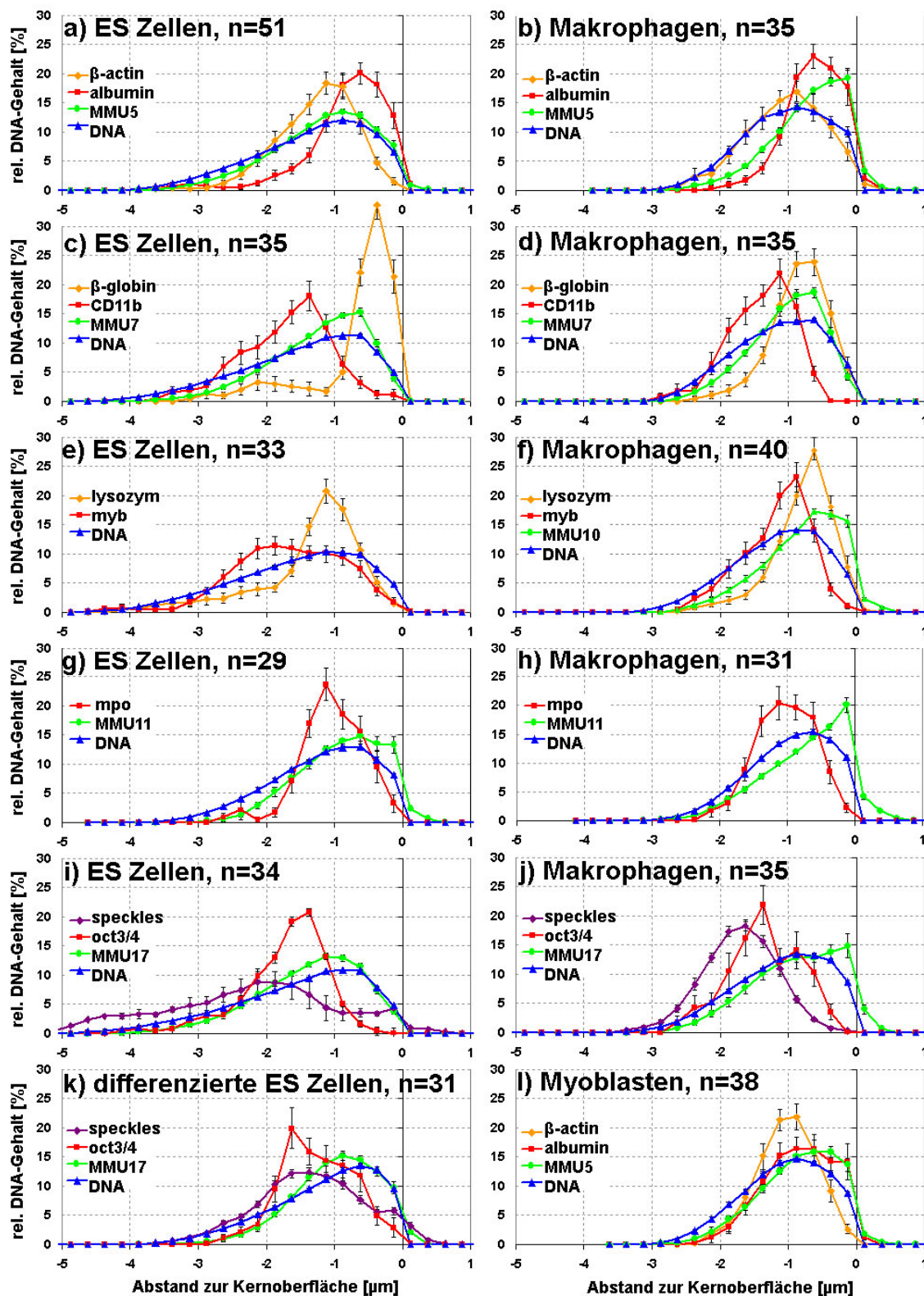


Abb. 40: Mittels EDTM berechneter radialer Abstand der Genloci und Chromosomenterritorien zur Kernoberfläche in mES-Zellen und in vitro differenzierten Makrophagen. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung des Mittelwerts dar.

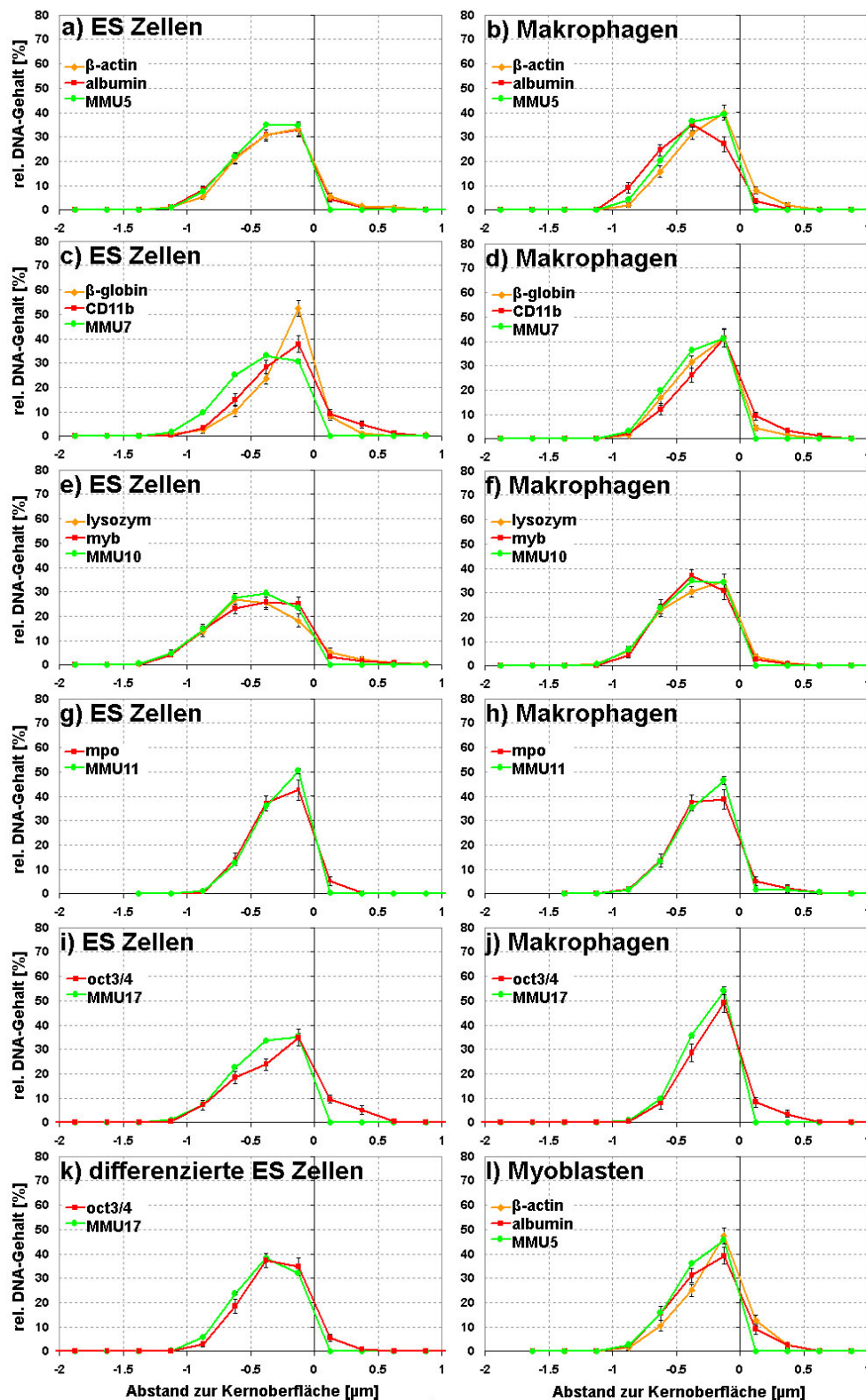


Abb. 41: Mittels EDTM berechneter radialer Abstand der Genloci zur Oberfläche der Chromosomenterritorien in mES-Zellen und in vitro differenzierten Makrophagen. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung des Mittelwerts dar.

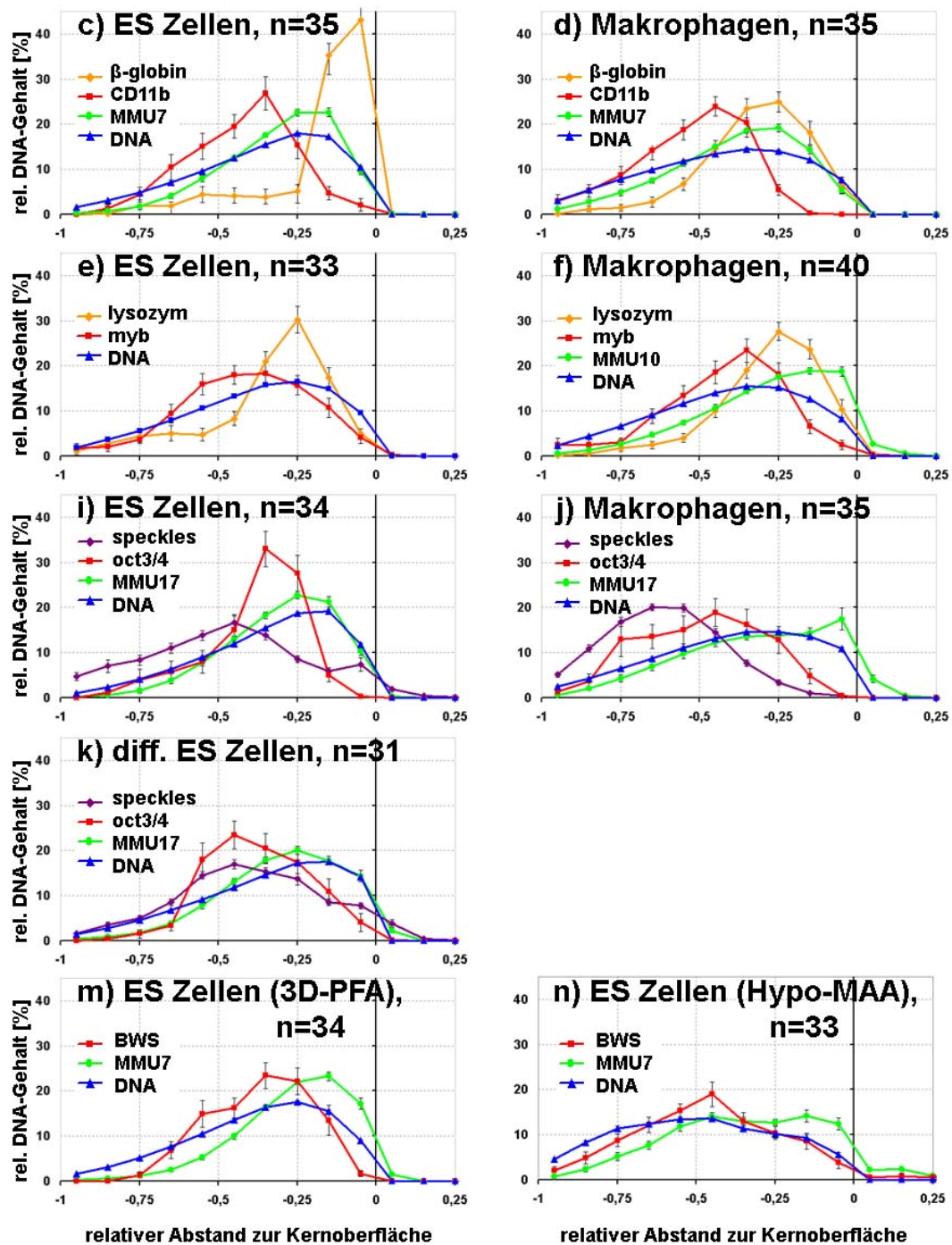


Abb. 42: Mittels EDTM berechneter und bezüglich der Kerngröße normalisierter, radialer Abstand der Genloci und Chromosomenterritorien zur Kernoberfläche. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung des Mittelwerts dar. Die Reihenfolge der Versuche in der Abbildung wurde beibehalten (vergleiche Abb. 40), jedoch wurde die Normalisierung nicht für alle Genloci durchgeführt. Die einzelnen Diagramme sind denen der nicht-normalisierten Berechnung sehr ähnlich. Auch die zugehörigen p-Werte (nicht angegeben) entsprechen, abgesehen von minimalen, nicht signifikanten Abweichungen, denen der nicht-normalisierten Berechnung (siehe Tabelle 6). Die unterschiedliche Kerngröße der einzelnen Zellen und Zelltypen scheint kaum Einfluss auf die Positionierung zu haben.

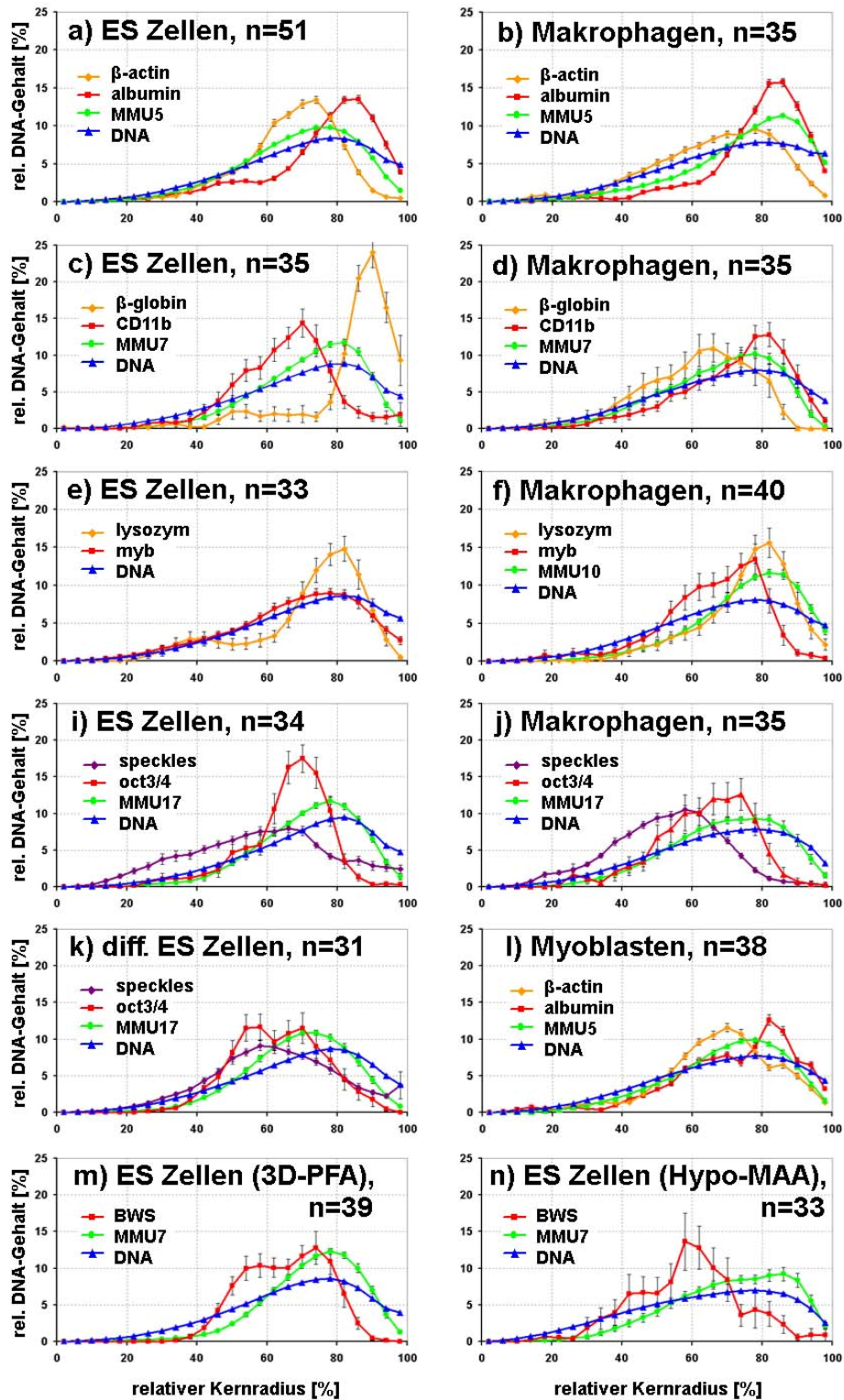


Abb. 43: Mittels 3D-RRD berechneter radialer Abstand der Genloci und Chromosomenterritorien zur Kernoberfläche in mES-Zellen und in vitro differenzierten Makrophagen. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung des Mittelwerts dar. Das Ergebnis dieser Art der Berechnung entspricht weitgehend dem der Berechnung mit EDTM (siehe Abb. 40 und Tabelle 6).

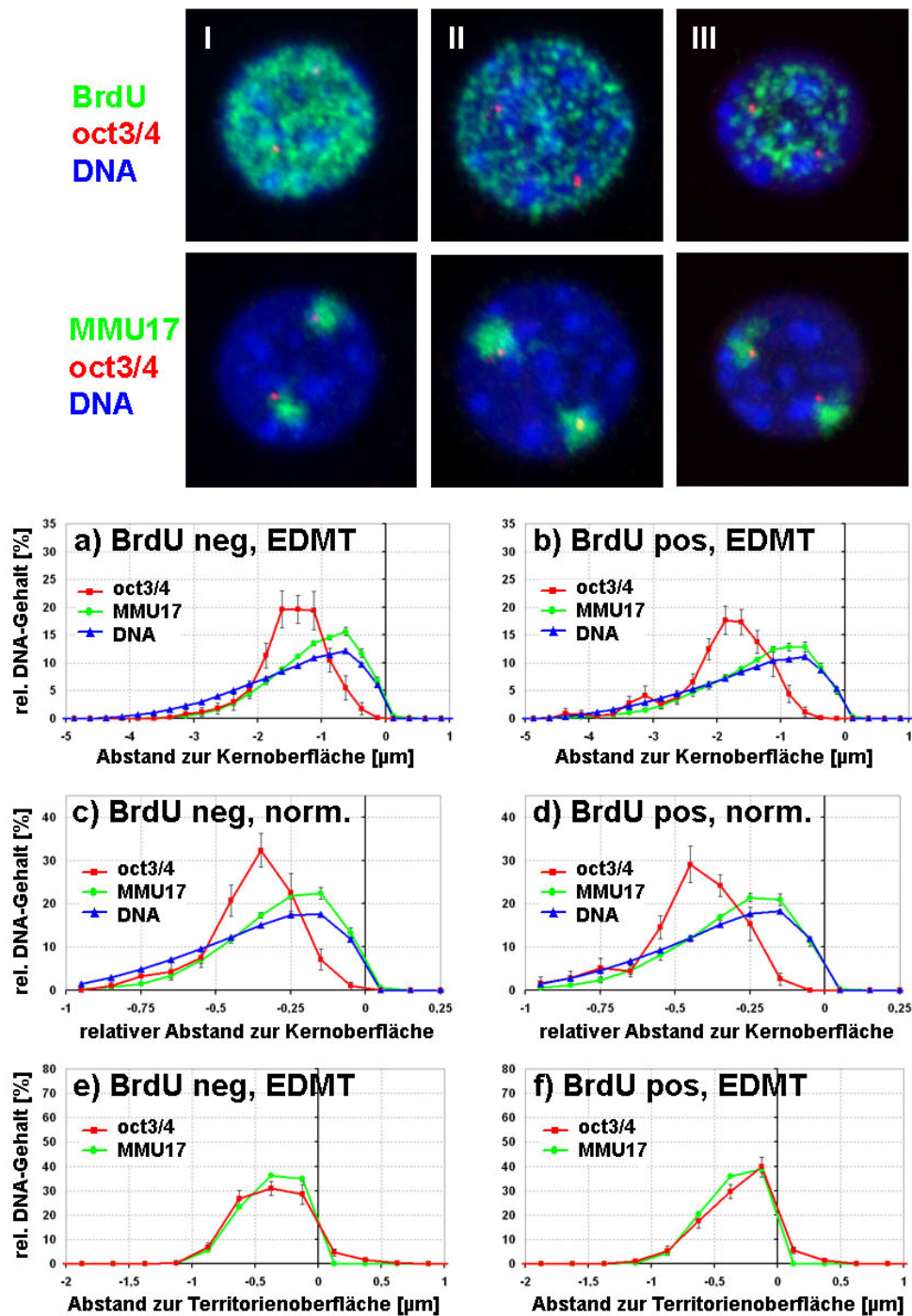


Abb. 44: Vergleich des radialen Abstands eines Genlocus (Oct3/4) zur Kern- und Territorienoberfläche in BrdU-positiven und -negativen mES-Zellen. Bei den RGB-Bildern handelt es sich um Projektionen drei verschiedener BrdU-positiver Kernbeispiele. Die obere Reihe zeigt den BrdU-Nachweis und den Genlocus, die untere das Territorium und den Genlocus der gleichen Kerne. Alle Berechnungen radialer Abstände erfolgten mittels EDTM: a, b) Berechnung des radialen Abstands zur Kernoberfläche. c, d) Berechnung mit normalisierter Kerngröße. e, f) Berechnung des radialen Abstands zur Territorienoberfläche. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung des Mittelwerts dar. Die Ergebnisse in BrdU-positiven und BrdU-negativen Zellkernen ähneln sich stark und die radialen Positionen des Locus und des Territoriums sind vergleichbar.

3.3.3 Genpositionen können je nach Zelltyp variieren

Die bevorzugte radiale Position eines Genlocus innerhalb eines Zellkerns ist abhängig vom Zelltyp. Um dies zu verdeutlichen, wurde der Anteil des Gensignals mit bestimmtem Abstand zur Kernoberfläche durch den DNA-Gehalt an dieser Stelle normalisiert bzw. dividiert (Abb. 45). Eine solche Normalisierung gleicht Unterschiede in der Kernform aus, welche ansonsten zu einem größeren Volumen an der Kernoberfläche von flachen Makrophagen im Vergleich zu kugelförmigen ES-Zellen führen (vergleiche DNA-Verteilung in Abb. 40b, d, f, h, i mit Abb. 40a, c, e, g, i). Die entsprechenden Berechnungen wurden freundlicherweise von Dr. Jürgen Peters am Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin der LMU München durchgeführt.

Eine stark zelltypabhängige radiale Positionierung im Kern wird für das β -Globin-Gen (Abb. 45c) deutlich, welches in Makrophagen weiter innen liegt als in ES-Zellen ($p = 0,029$). Das Gegenteil gilt für den CD11b-Locus auf demselben Chromosom und in derselben Zellpopulation. Ebenso liegen die Gene Lysozym ($p = 0,032$) und Myb ($p = 0,002$) in den ES-Zellen weiter innen (Abb. 45d).

Signifikante Unterschiede fanden sich auch bei der Verteilung des β -Actin-Locus ($p = 0,01$; Abb. 45a) und des Albumin-Locus ($p = 0,024$; Abb. 45b) in ES-Zellen, Makrophagen und Myoblasten. Zudem liegt der Albumin-Locus in ES-Zellen viel näher am Kernrand als der Durchschnitt des beinhaltenden MMU5 (Abb. 40a; $p < 0,001$), während in Makrophagen (Abb. 40b; $p = 0,1$) und Myoblasten (Abb. 40i; $p = 0,8$) ein solcher Unterschied nicht existiert. Demnach nimmt der Albumin-Locus nur in ES-Zellen, nicht aber in den beiden anderen Zelltypen, eine bestimmte, zum Kernrand gerichtete Subregion des Territoriums ein. Zelltypspezifische Positionierung in bestimmten Subregionen des Chromosomenterritoriums ist folglich nicht auf den β -Globin-Locus beschränkt.

Diese zelltypspezifische Verteilung von Chromosomenterritorien und Genloci im Nukleus sprechen gegen eine radiale Positionierung lediglich aufgrund genomischer Eigenschaften wie beispielsweise der lokalen Gendichte.

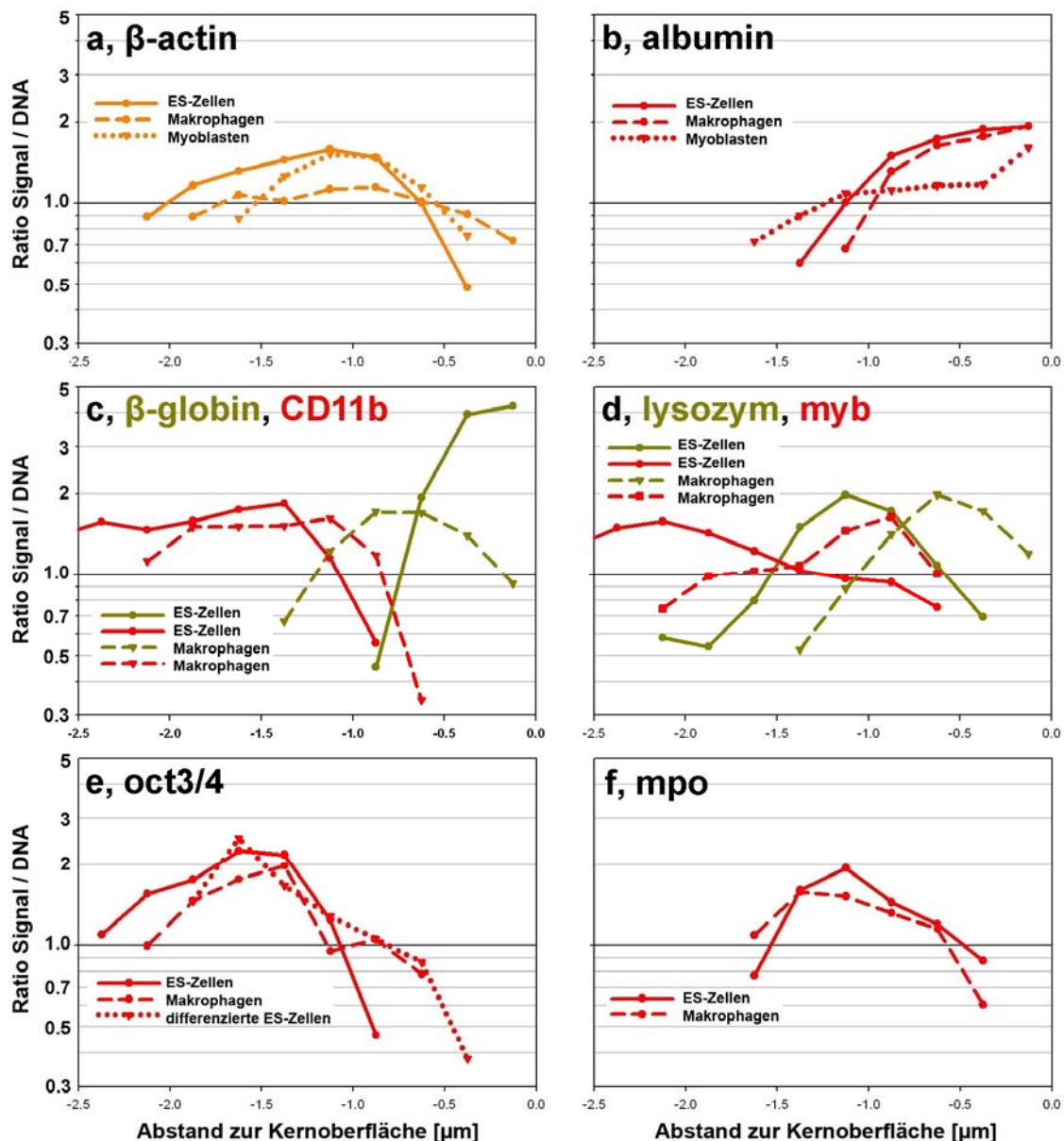


Abb. 45: Abstand der Genloci zur Oberfläche von DNA-normalisierten Zellkernen. Der prozentuale Anteil eines Gensignals mit einem bestimmten Abstand zur Kernoberfläche (siehe Abb. 40) wurde durch den DNA-Gehalt mit gleichem Abstand dividiert. Um zufällige Ergebnisse mit kleinen Werten zu vermeiden, wurden für die Berechnung ausschließlich Ausgangswerte für Gensignale und DNA einbezogen, deren prozentualer Anteil über 4% des gesamten Signals liegt. Die Kurven für einen bestimmten Genlocus in verschiedenen Zelltypen sind in einem Graphen dargestellt. Beispielsweise ist das β -Actin-Gen (a) in Makrophagen ähnlich wie die Kerngegenfärbung verteilt, nicht jedoch in ES-Zellen und Myoblasten, was für eine zelltypspezifische Verteilung spricht. Albumin (b), ein weiteres Gen auf demselben Chromosom, hat eine ähnliche Verteilung in ES-Zellen und Makrophagen, während die Verteilung in Myoblasten davon abweicht. Große Unterschiede zwischen den Zelltypen können auch bei β -Globin (c), Lysozym und Myb (d) beobachtet werden. Oct3/4 (e) zeigt Ähnlichkeiten zwischen differenzierten ES-Zellen und Makrophagen, während in undifferenzierten ES-Zellen das Signal weiter innen liegt. Mpo (f) zeigt nach der DNA-Normalisierung lediglich geringe Unterschiede in ES-Zellen und Makrophagen.

3.3.4 Genpositionierung korreliert nicht mit der lokalen Gendichte

	β-Act	Alb	Myb	Lys	β-Glob.	CD11b	Oct3/4	BWS	Mpo
Abst. zur Oberfl. ES-Zellen [μm]	1,3	0,8	1,7	1,4	0,7	1,7	1,7	1,5	1
Abst. zur Oberfl. Makroph. [μm]	1,04	0,62	1,2	0,8	0,8	1,4	1,3		1
Gene / Mb	25,6	13	12	17,5	69,5	38	73	16,5	19,5
CpG-Inseln / Mb	181,1	60	90	194	44,5	153,5	197,5	66,5	144,9
GC-Gehalt	48,31	40,60	42,41	44,18	39,13	45,89	48,12	47,81	45,78
SINEs:	21,36	6,05	7,5	12,08	3,54	16,65	14,13	8,82	20,16
Alu/B1	7,19	2,06	2,88	4,09	1,42	6,78	5,99	2,81	8,29
B2-B4	13,28	3,35	3,94	7,01	1,91	8,89	7,78	5,54	10,41
IDs	0,57	0,07	0,23	0,28	0,05	0,29	0,18	0,15	0,47
MIRs	0,31	0,57	0,45	0,68	0,15	0,69	0,18	0,31	1
LINEs:	3,31	17,36	9,47	6,18	33,13	7,98	5,69	7,16	3,66
LINE1	3,1	16,82	9,02	5,31	33,03	7,49	5,47	7	3,04
LINE2	0,19	0,49	0,42	0,83	0,08	0,42	0,19	0,14	0,5
L3/CR1	0,01	0,04	0,03	0,02	0,01	0,04	0,02	0,02	0,09
LTR-Elemente:	11,11	8,36	9,11	12,51	10,04	15,17	16,73	11,49	7,11
MaLRs	4,51	3,8	3,55	5,92	1,95	4,57	3,05	4,63	2,97
ERVL	1,5	0,65	0,91	1,62	1,17	2,16	2,01	1,46	0,74
ERV_classI	0,99	0,41	0,55	0,97	1,37	0,8	3,02	0,54	1,04
ERV_classII	4,11	3,48	4,07	4	5,56	7,64	8,64	4,87	2,35

Tabelle 8: Eigenschaften der untersuchten Genloci innerhalb eines 2 Mb Fensters. Die ersten beiden Zeilen zeigen den durchschnittlichen, mittleren Abstand des jeweiligen Locus zur Kernoberfläche in mES-Zellen und Makrophagen; die beiden folgenden Zeilen die Anzahl der Gene und CpG-Inseln pro Mb. Dabei gilt es zu beachten, dass momentan für den β-Actin- und Mpo-Locus lediglich eine 1,8 Mb Sequenz erhältlich ist (siehe Abb. 23). Alle darauffolgenden Zeilen geben den prozentualen Sequenzanteil der verschiedenen repetitiven Elemente innerhalb dieses Fensters an.

Für jeden untersuchten Genlocus wurde die durchschnittliche radiale Position im Zellkern berechnet und mit der Gendichte innerhalb eines 2 Mb und 10 Mb Fensters verglichen (Tabelle 8 und Tabelle 9, Abb. 46a). Der Pearson-Korrelationskoeffizient R (Tabelle 10) beschreibt die Korrelation von Genposition und Gendichte, wobei ein Wert von -1 eine perfekte negative und 1 eine positive Korrelation bedeutet. Weder in mES-Zellen ($R = -0,05$ für 2 Mb, $R = -0,15$ für 10 Mb) noch in Makrophagen ($R = 0,27$ und $0,08$) wurde eine deutliche Korrelation zwischen der Position des Locus und der Gendichte gefunden.

	β-Act	Alb	Myb	Lys	β-Glob	CD11b	Oct3/4	BWS	Mpo
Gene / Mb	20,6	17,4	11,1	9,8	41,4	18,8	38,9	31,1	14,1
CpG-Inseln / Mb	148,2	59,2	73,1	124,8	60	91,9	111,9	84,4	85,8
GC-Gehalt	46,87	40,57	41,36	41,93	42,13	45,38	43,58	47,93	43,01
SINEs:	16,69	6,34	6,39	7,44	8,77	10,99	9,28	9,1	13,75
Alu/B1	5,13	2,34	2,14	2,29	3,17	3,86	3,63	3,35	5,12
B2-B4	10,81	3,53	3,64	4,41	4,65	6,03	5,32	5,36	7,57
IDs	0,38	0,1	0,14	0,16	0,19	0,23	0,15	0,15	0,29
MIRs	0,37	0,37	0,45	0,57	0,77	0,88	0,18	0,25	0,77
LINEs:	8,03	27,01	16,23	13,58	23,93	9,97	21,88	9,22	10,05
LINE1	7,73	26,59	15,8	12,91	23,23	9,37	21,69	9,06	9,46
LINE2	0,24	0,38	0,36	0,58	0,06	0,52	0,16	0,14	0,48
L3/CR1	0,03	0,03	0,06	0,06		0,05	0,02	0,01	0,07
LTR-Elemente:	11,69	10,51	10,65	10,21	9,17	10,99	14,73	9,84	8,42
MaLRs	4,64	3,29	4,16	4,91	2,82	5,02	4,42	4,56	3,35
ERV_L	1,42	0,89	1,05	1,46	1	1,61	1,29	1,25	0,97
ERV_classI	0,76	1,57	0,84	0,6	0,87	0,52	1,48	0,41	0,67
ERV_classII	4,88	4,74	4,59	3,23	4,47	3,82	7,54	3,62	3,42

Tabelle 9: Genomische Eigenschaften innerhalb eines 10 Mb Fensters um die untersuchten Loci. Das Fenster des BWS-Locus beinhaltet lediglich 6,6 Mb, da dieser weniger als 2 Mb vom Telomer entfernt liegt.

3.3.5 Genpositionierung korreliert mit dem GC-Gehalt und einigen repetitiven Elementen

Anders als bei ganzen Maus-Chromosomen korreliert die Gendichte der in dieser Arbeit untersuchten Loci nicht mit dem GC-Gehalt ($R = -0,02$ und $0,26$ in Bezug auf ein 2 bzw. 10 Mb Fenster, Abb. 46b). Folglich erlauben die gewählten Loci eine Unterscheidung der Positionierung im Zusammenhang mit der Gendichte von Zusammenhängen mit anderen genomischen Eigenschaften wie dem GC-Gehalt, SINEs, LINEs und LTRs. Diese sind um die jeweiligen Loci innerhalb eines 2 Mb Fensters gleichmäßig verteilt (siehe Abb. 23).

Sowohl in ES-Zellen als auch in Makrophagen korreliert eine interne Kernposition mit einem hohen GC-Gehalt (Abb. 46c) und einem gehäuften Auftreten von LTR-Elementen ($R = 0,66$ und $0,61$, Abb. 46d) innerhalb des 2 Mb Fensters. Dagegen korreliert die Anwesenheit von LINEs (Abb. 46e) mit einer peripheren Genposition, ganz besonders in ES-Zellen ($R = -0,65$ und $-0,49$). Die Korrelation der Position mit CpG-Inseln und SINEs ist ebenfalls höher als mit der Gendichte (Abb. 15). Im Allgemeinen ist dabei die Korrelation der Positionierung mit genomischen Eigenschaften innerhalb des 2 Mb Ausschnitts größer als innerhalb von 10 Mb. Vermutlich führt ein größerer Bereich zu einer Abschwächung bestimmter positionsassoziierter Eigenschaften.

Obwohl der GC-Gehalt und bestimmte repetitive Elemente mit der Position von Genloci im Zellkern korrelieren, so scheint der beste Indikator für die radiale Position in Makrophagen dennoch die Position in ES-Zellen zu sein und umgekehrt ($R = 0,83$; Abb. 46f).

	2 Mb Fenster				10 Mb Fenster			
	ES: R	ES: R ²	Mak: R	Mak: R ²	ES: R	ES: R ²	Mak: R	Mak: R ²
ES / Mak	0,83	0,68						
Gene / Mb	-0,05	0	0,27	0,08	-0,15	0,02	0,08	0,01
CpG-Inseln / Mb	0,49	0,24	0,47	0,22	0,39	0,16	0,27	0,07
GC-Gehalt	0,61	0,37	0,63	0,40	0,36	0,13	0,56	0,31
SINEs:								
Alu/B1	0,27	0,08	0,46	0,22	-0,06	0	0,27	0,07
B2-B4	0,29	0,08	0,56	0,31	-0,09	0,01	0,32	0,10
B2-B4	0,27	0,08	0,41	0,17	-0,02	0	0,24	0,06
IDs	0,17	0,03	0,30	0,09	-0,10	0,01	0,23	0,05
MIRs	-0,07	0	-0,06	0	-0,29	0,08	0,03	0
LINEs:								
LINE1	-0,65	0,42	-0,49	0,24	-0,42	0,18	-0,46	0,21
LINE2	-0,64	0,41	-0,48	0,23	-0,41	0,17	-0,45	0,20
LINE2	0,07	0,01	-0,25	0,06	0,18	0,03	0,03	0
L3/CR1	-0,17	0,03	0,04	0	-0,10	0,01	-0,02	0
LTR-Elemente:								
MaLRs	0,66	0,43	0,61	0,37	0,57	0,32	0,51	0,26
MaLRs	0,45	0,20	0	0	0,84	0,70	0,58	0,33
ERVL	0,65	0,42	0,64	0,41	0,64	0,42	0,54	0,29
ERV_classI	0,20	0,04	0,37	0,14	-0,23	0,05	-0,25	0,06
ERV_classII	0,51	0,26	0,64	0,40	0,22	0,05	0,33	0,11

Tabelle 10: Pearson-Korrelationskoeffizient R und Determinationskoeffizient R² bezüglich der durchschnittlichen Genlocusposition und verschiedener genomischer Eigenschaften innerhalb des 2 und 10 Mb Fensters (siehe Tabelle 8 und Tabelle 9). R² spiegelt den Anteil der Varianz in der Verteilung wider, welcher mittels der untersuchten Eigenschaften statistisch erklärbar ist. Beispielsweise können bei ES-Zellen 37% der Variabilität in der Verteilung der Genloci mittels des GC-Gehalts statistisch erklärt werden.

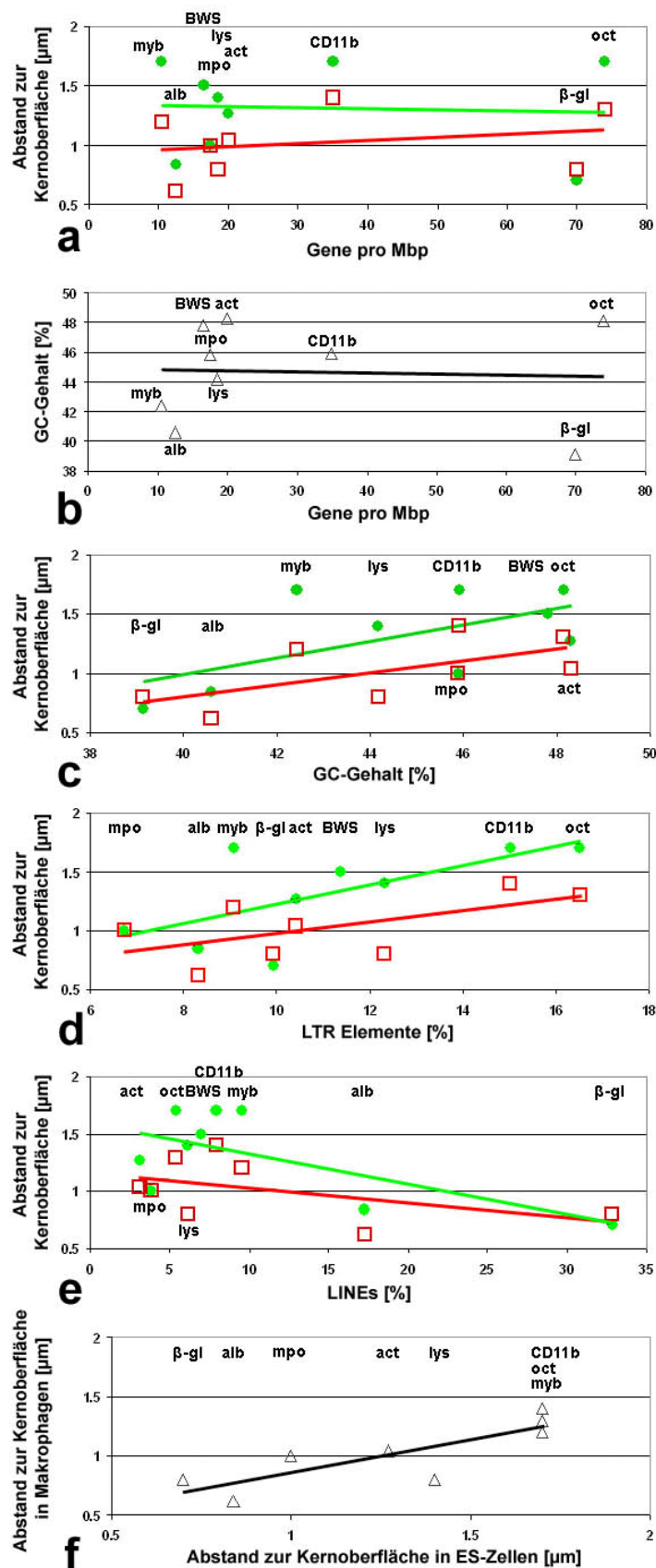


Abb. 46: Genomische Eigenschaften der Genloci und ihr Abstand zur Kernoberfläche. Bei den verwendeten Genloci korreliert die Gendichte weder mit dem Abstand zur Kernoberfläche (a), noch mit dem GC-Gehalt (b). Dagegen existieren Korrelationen des Abstands zur Kernoberfläche mit dem GC-Gehalt (c), LTR-Elementen (d) und LINEs (e) innerhalb eines 2 Mb Fensters, sowie zwischen den beiden Zelltypen (f). Grüne Punkte und Linien repräsentieren ES-Zellen, rote Quadrate und Linien Makrophagen.

3.3.6 Genposition und Expression

Um die Beziehung zwischen Genposition und Transkription untersuchen zu können, wurde die Expression in mES-Zellen mittels RT-PCR bestimmt (Abb. 47, für Primersequenzen und Bandenlängen siehe Tabelle 5, für Positivkontrolle der RT-Primer siehe Abb. 27). Untersucht wurden alle Gene auf den als FISH-Sonden verwendeten BACs und zusätzlich einige benachbarte Gene. In Makrophagen war dies nicht möglich, da durch die in vitro Differenzierung nur eine sehr begrenzte Zahl an Zellen erzeugt werden konnte. Außer für den β -Globin-Locus, konnte in ES-Zellen bei allen getesteten Regionen mRNA detektiert werden, zumindest für ein einzelnes Gen. Mit dem Albumin-Locus assoziierte Gene werden nur äußerst schwach exprimiert, während der β -Actin-, CD11b-, Myb-, Lysozym- und Oct3/4-Locus je mindestens ein stark exprimiertes Gen enthalten.

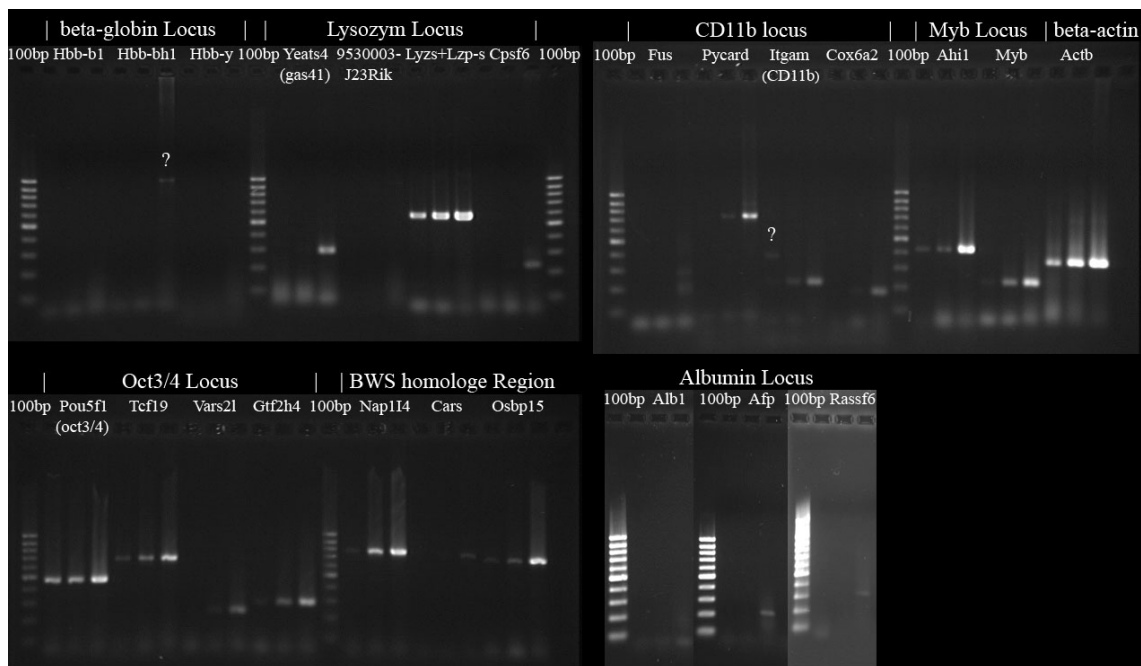


Abb. 47: Expressionslevel von Genen in mES-Zellen, welche die untersuchten Loci umgeben. Für jedes getestete Gen wurden drei RT-PCRs mit unterschiedlichen cDNA-Verdünnungen durchgeführt: 1:100 (linke Spur), 1:10 (mittlere Spur) und unverdünnt (rechte Spur). Die RT-PCR für den Albumin-Locus wurde von A. Mannes durchgeführt. Die Gennamen wurden der Ensembl Datenbank entnommen, alternative Namen befinden sich in Klammern. Alle Amplifikate besitzen die erwartete Bandenlänge des cDNA-Produkts, mit Ausnahme der Hbb-bh1 Bande (entspricht genomischer DNA) und einer nicht identifizierbaren Bande bei Itgam 1:100. Die Primer für das Lysozym generieren cDNA-Banden für die beiden benachbarten Gene Lysozym M und Lysozym P, welche sich in der Länge um lediglich 2 bp unterscheiden. Zumindest ein stark exprimiertes Gen (sichtbare Amplifikate in allen drei Verdünnungen) wurde für den Lysozym-, CD11b-, Myb-, β -Actin-, Oct3/4- und BWS-Locus detektiert, sowie schwache Expression am Albumin-Locus und gar keine Expression am β -Globin-Locus.

Vergleicht man die Expressionslevel mit der Position im Kern, so liegen der Albumin- und der β -Globin-Locus am weitesten außen (siehe Abb. 40a und e). Dabei handelt es sich um die beiden Loci, bei denen keine oder nur geringe Expression festgestellt wurde.

3.3.7 Splicing Speckles

Um mögliche Unterschiede in der Assoziation von Oct3/4 mit Splicing Speckles zu detektieren, wurden diese nach der FISH mittels eines spezifischen Antikörpers in Mausezellen nachgewiesen (siehe 2.3.11 und Abb. 39). Verwendet wurden dafür undifferenzierte mES-Zellen, unspezifisch differenzierte mES-Zellen (siehe 2.1.6), sowie postmitotische Maus-Makrophagen.

Während der Nachweis mit dem Antikörper gegen SF2/ASF in Makrophagen zu einem typischen Specklemuster führt, entsteht in ES-Zellen ein wesentlich feiner strukturiertes, punktförmiges Muster (siehe Abb. 39). Das gleiche Muster zeigen auch Kontrollexperimente auf ES-Zellen ohne FISH. Dieses Muster verhindert eine Analyse der Beziehung von Genoci mit Splicing Speckles, da das Gensignal räumlich immer sehr eng mit einem Specklesignal assoziiert ist. Splicing Speckles besitzen eine mehr im Kerninneren gelegene Signalverteilung als die DNA-Gegenfärbung, der Oct3/4-Locus und das zugehörige MMU7-Territorium (siehe Abb. 40i-k).

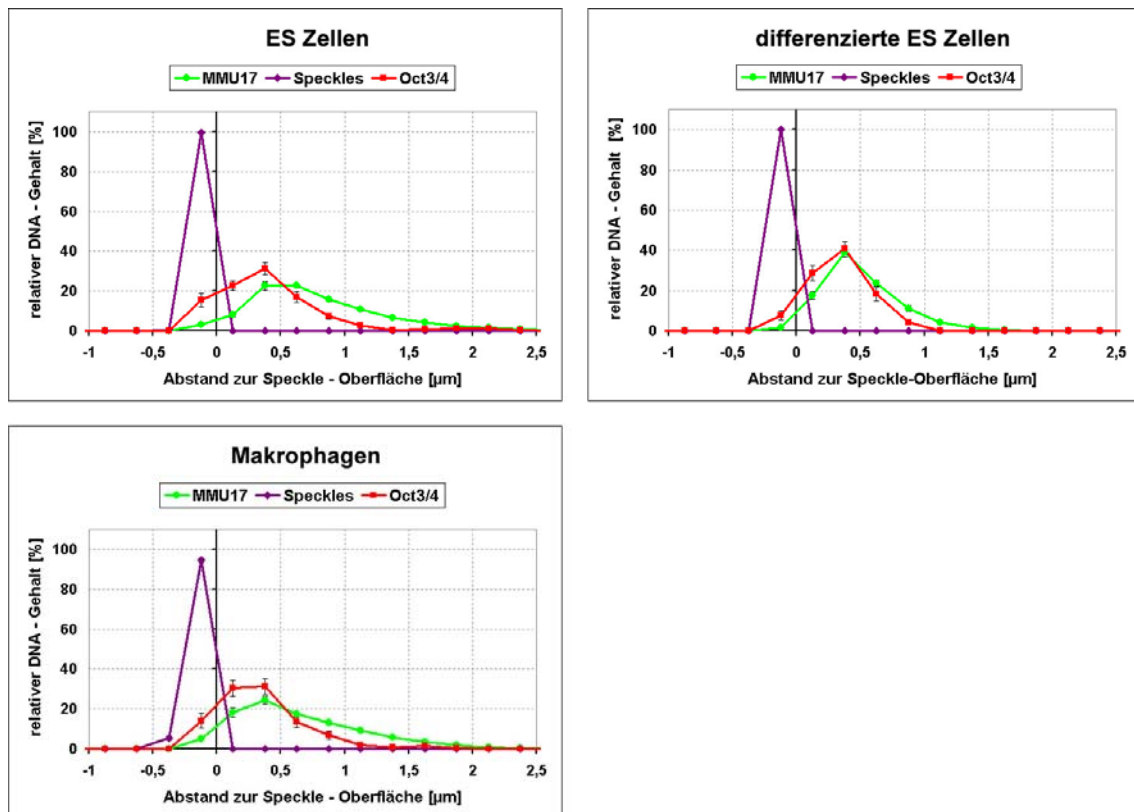


Abb. 48: Quantitative Verteilung von Oct3/4 und dem zugehörigen MMU7 bezüglich der Oberfläche von Splicing Speckles. Alle drei Verteilungen innerhalb einer der drei Zelltypen (ES-Zellen, differenzierte ES-Zellen und Makrophagen) unterscheiden sich voneinander jeweils signifikant ($p < 0,001$). Zwischen den untersuchten Zelltypen konnte kein Unterschied in der Verteilung der drei Signale festgestellt werden. Genlocus und Territorium liegen überwiegend außerhalb der Referenz. Der aktive Oct3/4-Locus (ES-Zellen) ist nicht stärker mit den Speckles assoziiert als der inaktive Locus (differenzierte ES-Zellen, Makrophagen). Das spezielle, fein gepunktete Specklemuster in ES-Zellen (siehe Abb. 39) erschwert jedoch eine zuverlässige Beurteilung dieser Auswertung.

Zusätzlich wurde die Verteilung von Oct3/4 und MMU17 gegen die Speckles als Referenz in ES-Zellen, differenzierten ES-Zellen und Makrophagen gemessen (Abb. 48). Damit sollte herausgefunden werden, ob der speziell in ES-Zellen aktive Locus in diesen Zellen stärker mit Speckles assoziiert ist als in Makrophagen. Es konnten jedoch keine Unterschiede zwischen den beiden Zelltypen festgestellt werden, was ebenfalls an dem ungewöhnlichen Specklemuster liegen könnte.

3.4 Räumliche Verteilung der elterlichen Genome am Beispiel des Hybriden *E. caballus* × *E. asinus* (Maultier)

Bei einem Maultier handelt es sich um eine Kreuzung aus einer Pferdestute (*Equus caballus*) und einem Eselhengst (*Equus asinus*). Das Ergebnis ist ein Hybride mit 63 Chromosomen, wovon 32 vom Mutter- und 31 vom Vattertier stammen. Der letzte gemeinsame Vorfahre von Pferd und Esel lebte vor ca. zwei Millionen Jahren (Yang 2004). Seitdem entwickeln sich die Genome der beiden Spezies unabhängig voneinander. Die DNA-Sequenz von Esel und Pferd unterscheidet sich hauptsächlich in Bereichen außerhalb der Gene, in den repetitiven Elementen wie beispielsweise Satelliten-DNA (Wijers 1993). Die Anhäufung von Mutationen übt dort keinen negativen Selektionsdruck auf die Individuen aus. Das gab Grund zu der Annahme, dass mittels genomischer FISH-Sonden beider Arten, maternale und paternale DNA in Hybridzellen eines Maultiers getrennt nachgewiesen werden kann (siehe 2.3.7). Damit ergibt sich die Möglichkeit homologe Chromosomen zu unterscheiden und ihre Verteilung in Interphasekernen zu beobachten.

3.4.1 Hybridisierung auf Metaphasechromosomen

Für Pferd und Esel wurden haptenmarkierte, genomische Sonden hergestellt (siehe 2.3.1 und 2.3.2). Alle Experimente wurden mit reziproker Sondenmarkierung durchgeführt (siehe Tabelle 3) und folglich für jedes Experiment Präparate mit unterschiedlichem Hybridisierungsmix ausgewertet. In den folgenden Abbildungen wird als Beispiel meist nur eines der beiden Detektionsschemata gezeigt.

Die Sonden beider Spezies wurden zunächst auf Metaphasen von Pferd- und Esel-Lymphozyten und schließlich auf Maultiermetaphasen hybridisiert (Abb. 49). Vorversuche im Rahmen eines Laborpraktikums von A. Mayer hatten bereits gezeigt, dass die genomische DNA-Sonde des Pferds bevorzugt auf Chromosomen des Pferds und die genomische DNA-Sonde des Esels bevorzugt auf Chromosomen des Esels hybridisiert.

Indem man die Hybridisierungszeit vergleichsweise kurz und die DNA-Konzentration gering wählt (siehe 2.3.8), lagern sich zwar in großem Umfang repetitive Abschnitte der genomischen Sonden an, jedoch noch nicht genügend andere Sequenzen, die ein sichtbares Signal erzeugen könnten. Dies führt zu einer bevorzugten Markierung repetitiver Abschnitte durch die genomischen Sonden, insbesondere der Zentromere (Abb. 50). Diese besitzen ausreichend Sequenzunterschiede, um Chromosomen von Pferd und Esel unterscheiden zu können.

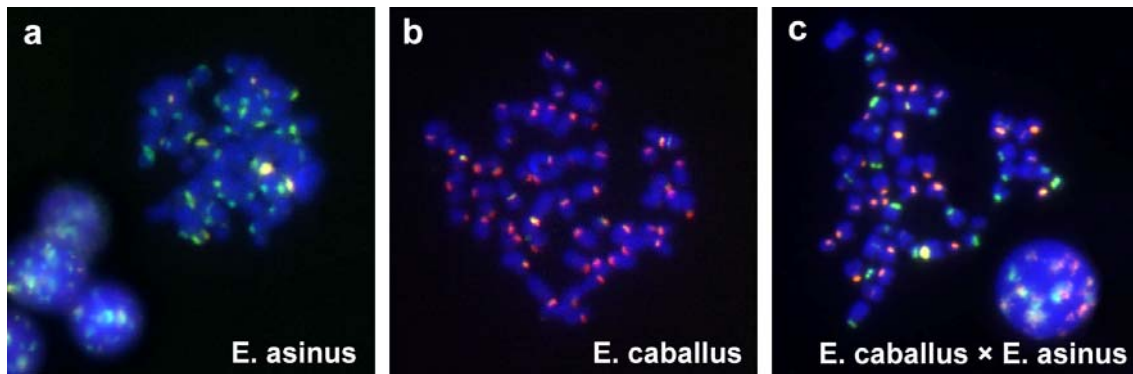


Abb. 49: Ein Hybridisierungsmix aus den beiden gesamtgenomischen Sonden von Esel (grün) und Pferd (rot) wird zunächst auf Metaphasen des Esels (a) und des Pferds (b) getestet. Präparate des Esels binden beinahe ausschließlich die Esel-Sonde und Chromosomen des Pferds überwiegend die Sonde des Pferds. Zum Vergleich die Hybridisierung mit dem gleichen Sondenmix auf einem Präparat des Maultiers (c). Signale beider Spezies sind deutlich zu erkennen und lassen auf die unterschiedliche Herkunft der einzelnen Chromosomen schließen. (Die abgebildeten Metaphasen sind nicht vollständig.)

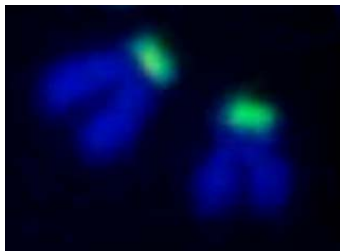


Abb. 50: Zwei akrozentrische Eselchromosomen. Die Hybridisierungsbedingungen wurden so gewählt, dass hauptsächlich repetitive Bereiche der Zentromere (grün) markiert sind, nicht jedoch single-copy-Sequenzen (blau).

Die meisten Chromosomen können eindeutig ihrer maternalen (Pferd) oder paternalen (Esel) Herkunft zugeordnet werden, je nachdem welches Signal am Zentromer überwiegt (Abb. 51). Einige Chromosomen können nicht zugeordnet werden, da sie keines der beiden Signale aufweisen. Sie fallen aber aufgrund ihrer relativ geringen Anzahl bei der Auswertung in 3D-Kernen kaum ins Gewicht.

Auf etlichen Maultier-Chromosomen kommt es zu einer Kreuzhybridisierung der Pferd- und Esel-Sonde. Dies geschieht dann, wenn sich die repetitiven Sequenzen der beiden Spezies relativ ähnlich sind (Wijers 1993) und beide Sonden auf einem Chromosom binden können. Das bedeutet, dass einige Zentromere des Pferds auch ein Hybridisierungssignal des Esels aufweisen und umgekehrt Zentromere des Esels nicht völlig frei von Signalen der Pferdesonde sind. Meist ist jedoch eines der beiden Signale deutlich stärker ausgeprägt, so dass Chromosomen einer Metaphasespreitung bei Überlagerung der beiden Farbkanäle trotzdem eindeutig einer der beiden Spezies zugeordnet werden können. Nur in einem Fall zeigt ein Maultierchromosom, welches mittels vorhergehender FISH auf Metaphasen beider Spezies eindeutig dem Esel zugeordnet werden konnte, besonders deutliche Signale des Pferds (Abb. 52).

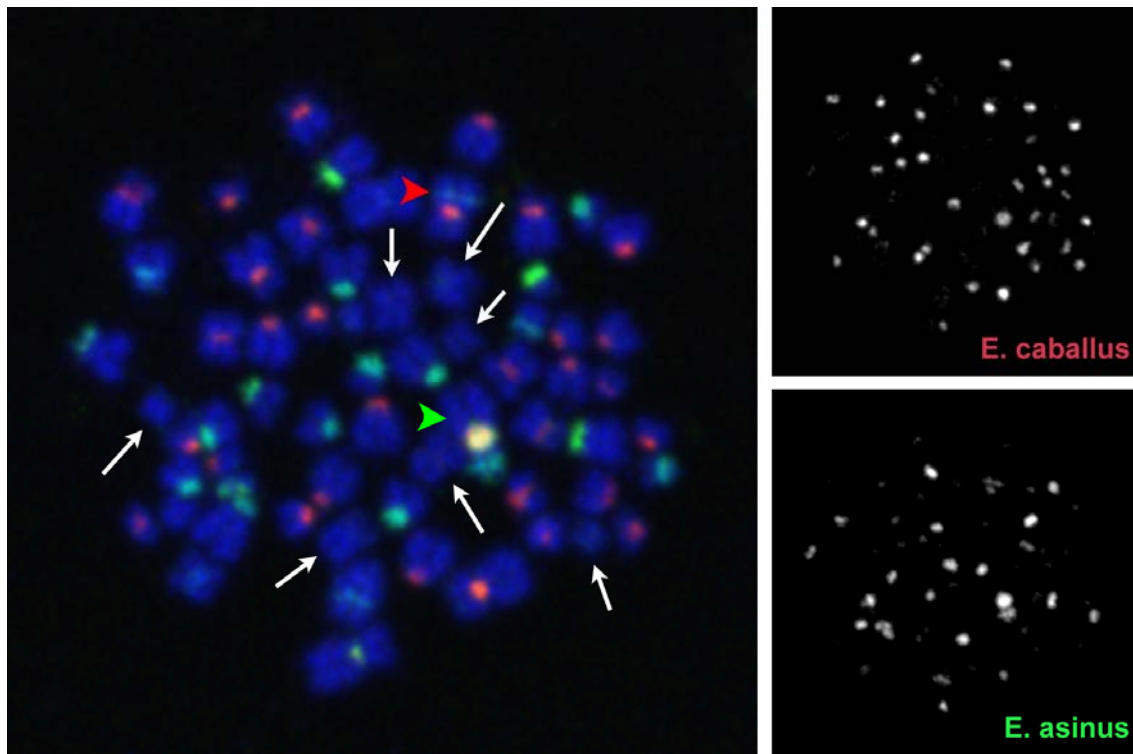


Abb. 51: Deutlich unterscheidbare Pferd- (rot) und Esel-Chromosomen (grün) in einer Metaphasespreitung des Maultiers. Ungefähr sieben (von 63) Chromosomen können keiner der beiden Elternspezies zugeordnet werden, da sie kein Zentromersignal aufweisen (weiße Pfeile). Die Mehrheit der Chromosomen zeigt Kreuzhybridisierung, da beide Sonden ein Signal an derselben Position erzeugen (Vergleich der beiden Abb. rechts). Jeweils eines der beiden Signale ist jedoch stärker und dominiert in der Überlagerung. Ein Chromosom (grüne Pfeilspitze) besitzt ein besonders starkes Kreuzhybridisierungssignal (gelb). Es konnte dem Esel zugeordnet werden (siehe Abb. 52). Ein weiteres Chromosom, welches dem Pferd zugeordnet wurde, zeigt unterhalb des Zentromers Signale des Esels (rote Pfeilspitze).

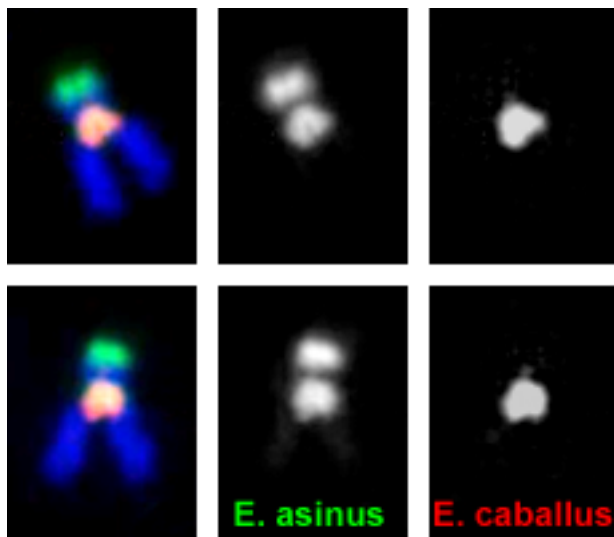


Abb. 52: Homologe Eselchromosomen mit Kreuzhybridisierung von Pferd- (rot) und Esel-Signal (grün) unterhalb der Zentromerregion. Entsprechende Sequenzen müssen bereits vor der Auftrennung der beiden Spezies vorhanden gewesen sein. Die Chromosomen besitzen ein sehr charakteristisches Aussehen und eines der Homologen kann in Metaphasespreitungen des Maultiers identifiziert werden (siehe grüne Pfeilspitze in Abb. 51).

3.4.2 2D-FISH auf Interphasekernen deutet auf eine zufällige Verteilung maternaler und paternaler Chromosomen hin

Neben Metaphasen wurden auch ca. 60 2D-Interphasekerne von Maultier-Lymphozyten und einige Fibroblasten mit hybridisierter Pferd- und Eselsonde aufgenommen. Diese befanden sich neben den Metaphasen auf den 2D-Präparaten und mussten nicht extra angefertigt werden. Die Bilder legen eine gleichmäßige und damit zufällige Verteilung maternaler Pferde- und paternaler Eselchromosomen nahe (Abb. 53). Zusätzlich wurden mehrere hundert Lymphozyten und Fibroblasten gesichtet. Nur ungefähr 1% der Kerne zeigen zumindest scheinbar ein etwas abweichendes Verteilungsmuster (Abb. 54). Um eine quantitative Analyse zu ermöglichen, wurde eine radiale Auswertung von 3D-Präparaten durchgeführt (siehe 3.4.3.1).

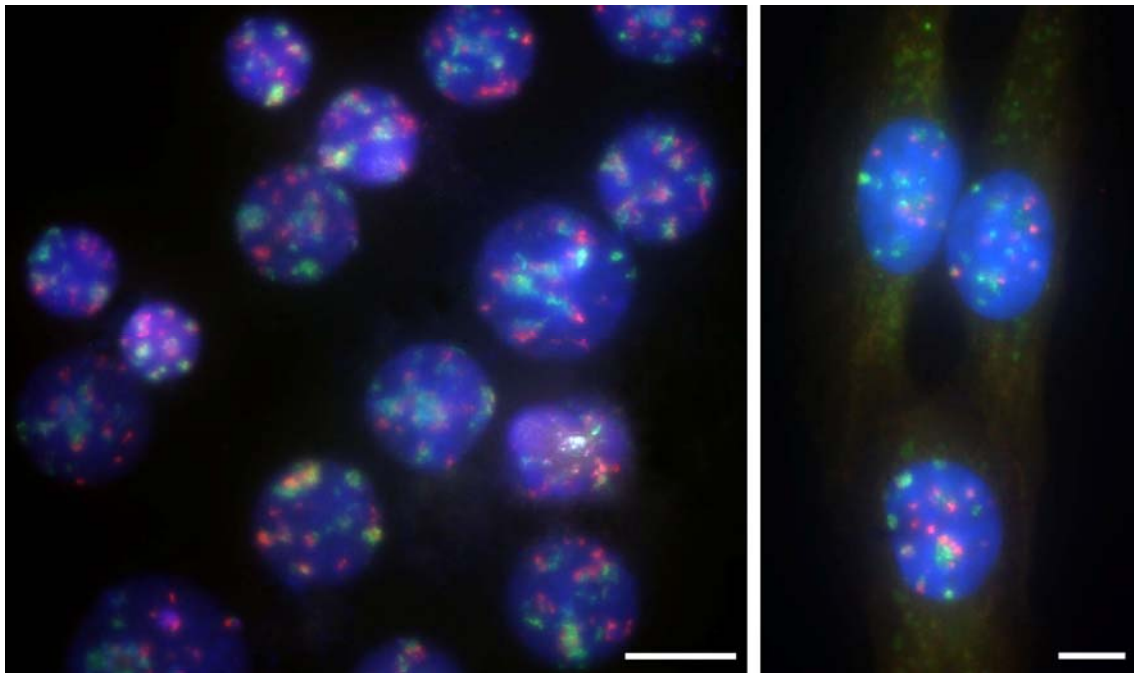


Abb. 53: FISH auf 2D-Interphasekernen von Lymphozyten (links) und Fibroblasten (rechts) des Maultiers. Es handelt sich um Projektionen, wobei die Eselsonde grün und die Pferdesonde rot dargestellt ist. Beide Signale scheinen annähernd gleichmäßig innerhalb der Kerne verteilt zu sein. Maßstab: 5 μm .

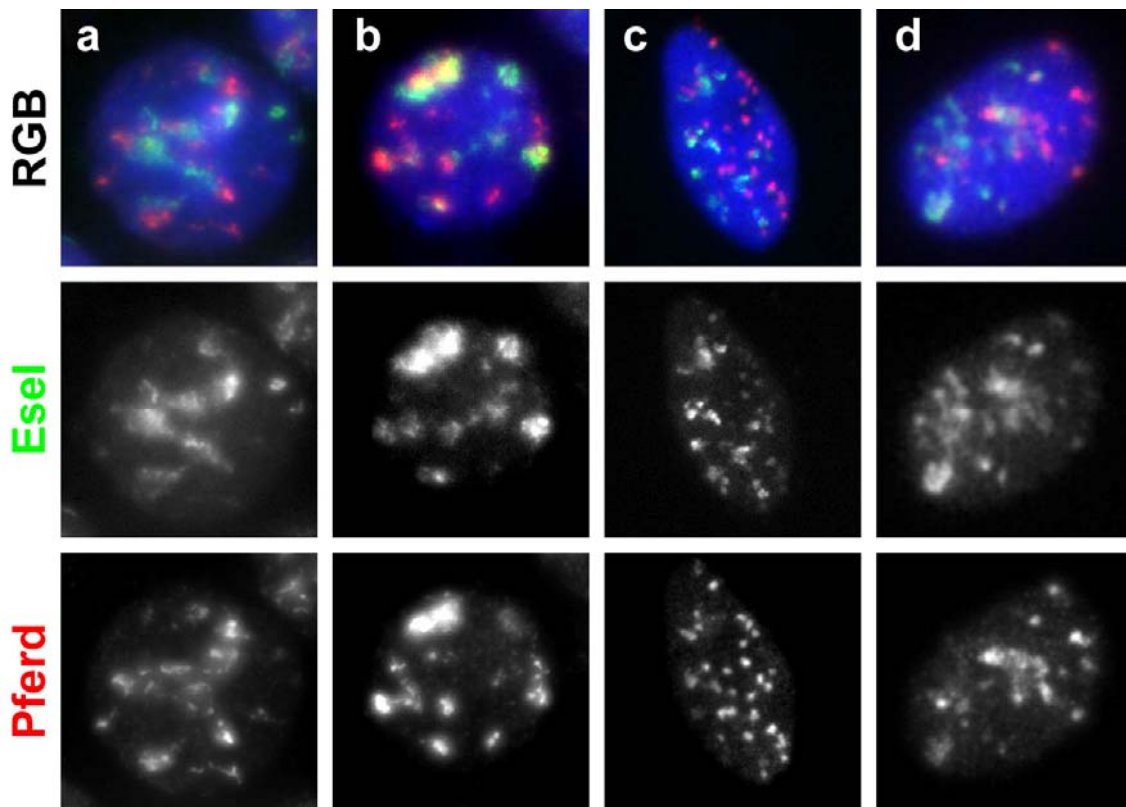


Abb. 54: Ungefähr 1% der 2D-fixierten Lymphozyten (a, b) und Fibroblasten (c, d) des Maultiers zeigen bei näherer Betrachtung eine scheinbar nicht-zufällige Verteilung der Signale von Pferd (rot) und Esel (grün) in den RGB-Projektionen. Dabei ist jedoch kein allgemeines Verteilungsmuster zu erkennen. Einige Kerne zeigen Signale der einen Spezies bevorzugt innen und die der anderen außen (a), während bei anderen die elterlichen Genome scheinbar mittels einer durchgehenden Linie weitgehend trennbar sind (b, c, d). Diese Linie kann in den ovalen Kernen der Fibroblasten wiederum unterschiedliche Ausrichtungen haben (c, d). Betrachtet man jedoch die einzelnen Farbkanäle, so wirken die Unterschiede in der Verteilung weit weniger auffällig, da hier auch die schwächeren Signale besser zur Geltung kommen.

3.4.3 Dreidimensionale Verteilung maternaler und paternaler Chromosomen

Die genomischen Sonden von Pferd und Esel wurden auf 2D-Präparaten getestet, gegebenenfalls optimiert und anschließend auf 3D-Präparate von Maultierzellkernen hybridisiert. Dazu wurden zwei reziprok markierte Hybridisierungsmixe (siehe 2.3.7, Tabelle 3) in je zwei Ansätzen auf primäre Maultier-Fibroblasten und -Lymphozyten gegeben (Abb. 55, RGB-Projektionen aller Kerne siehe beigelegte CD). Einige Zellkerne wurden anschließend mit der Software *AMIRA* (siehe 2.6.2) dreidimensional rekonstruiert (Abb. 56, Dateien siehe CD). Mit dem reziproken Ansatz sollte sichergestellt werden, dass die Art der Markierung keinen signifikanten Einfluss auf die radiale Positionierung der Signale hat.

Insgesamt wurden 55 Fibroblasten- und 46 Lymphozyten-Nuklei mit dem Laser-Scanning-Mikroskop aufgenommen. Von den Fibroblasten wurden zusätzlich 30 Prometaphasen gescannt (Tabelle 11).

Hyb.mix	Fibroblasten	Lymphozyten
1	26 Nuklei 16 Pro-/Metaphasen (3D)	21 Nuklei
2	29 Nuklei 14 Pro-/Metaphasen (3D)	25 Nuklei
Σ	55 Nuklei 30 Pro-/Metaphasen (3D)	46 Nuklei

Tabelle 11: Übersicht der 3D-FISH Experimente auf Präparaten von Maultierzellen. Anzahl der mit dem konfokalen LSM aufgenommenen Interphasekerne und Mitosen.

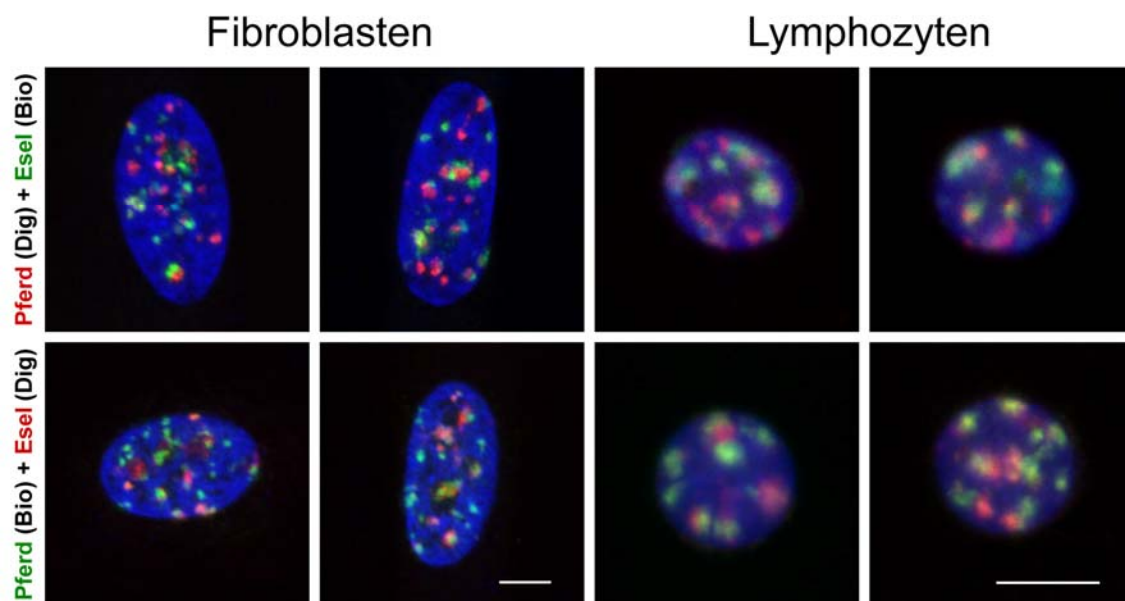


Abb. 55: Beispiele für 3D-FISH auf Maultierzellkernen (Projektionen von 3D-Bildstapeln). Für die Hybridisierung auf Fibroblasten und Lymphozyten wurden je zwei reziproke Markierungsschemata verwendet: Pferd (Biotin) + Esel (Digoxigenin) und Pferd (Digoxigenin) + Esel (Biotin). Die Höhe der Zellen in z-Richtung beträgt bei den Fibroblasten durchschnittlich 8 μm und bei den Lymphozyten 9,4 μm . Maßstab: 5 μm .

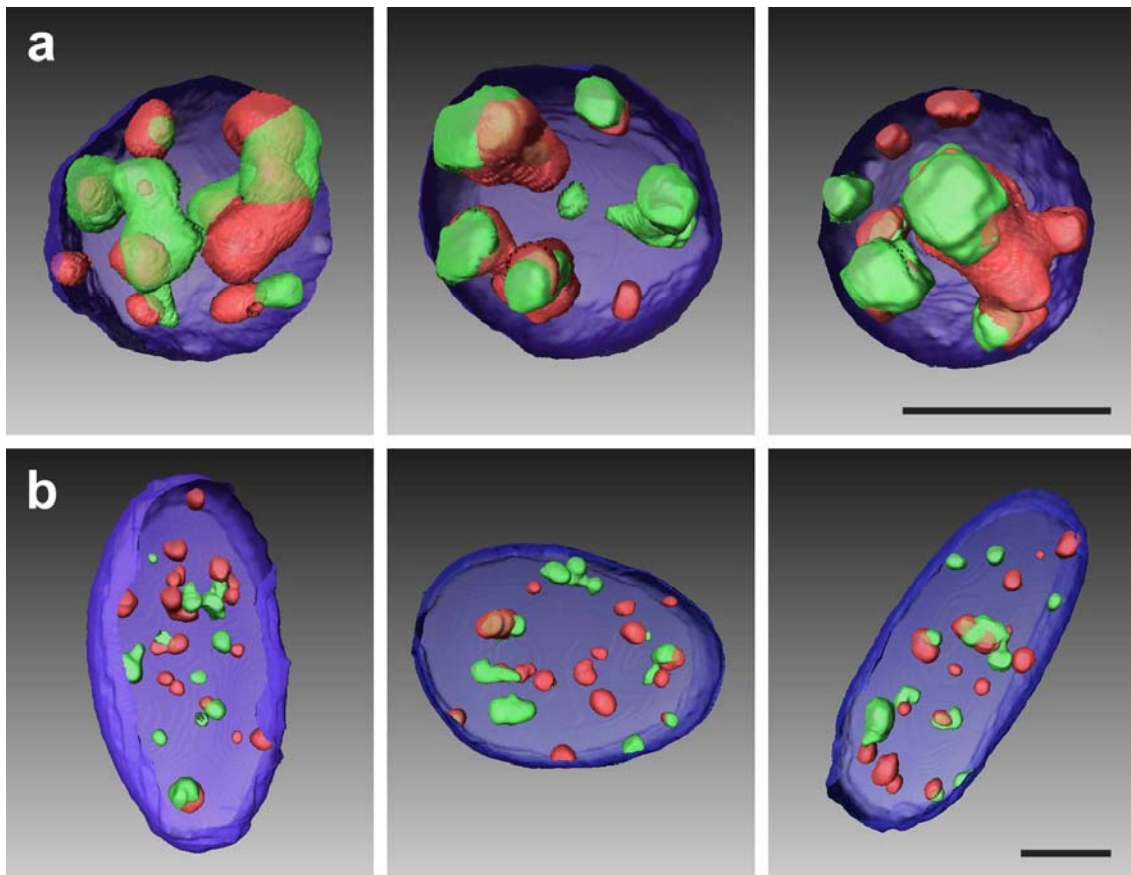


Abb. 56: Rekonstruierte Interphasekerne von Lymphozyten (a) und Fibroblasten (b) des Maultiers nach 3D-FISH. Zentromere des Pferds sind in rot und die des Esels in grün gezeigt. Die Kernhülle der Interphasen wird aufgeschnitten dargestellt, um in den Kern blicken zu können. Bei einigen Kernen handelt es sich um die gleichen wie in der oberen Abbildung der Projektionen. So entsprechen die beiden äußeren Fibroblastenkerne dieser Abbildung den beiden oberen in Abb. 55, sowie der mittlere Lymphozytenkern dem Kern oben rechts. Es ist deutlich zu sehen, dass sich Zentromere beider Elterngenome zu Clustern zusammenlagern (siehe 3.4.3.3). Diese sind in Lymphozyten wesentlich größer und die Anzahl geringer als in Fibroblasten. Maßstab: 5 μm .

3.4.3.1 Keine feststellbare Genomseparation maternaler und paternaler Interphasechromosomen

Radiale Auswertungen wurden mittels EDT (siehe 2.7.3) durchgeführt. Dabei wurde der Abstand der maternalen (Pferd) und paternalen (Esel) Signale zur Kernoberfläche in Fibroblasten und Lymphozyten gemessen (Ergebnisdateien siehe beigelegte CD).

Die Ergebnisse für die beiden Hybridisierungsmixe mit reziproker Sondenmarkierung wurden jeweils getrennt ausgewertet und schließlich in einem Graphen zusammengefasst.

Radiale Verteilung in Fibroblasten

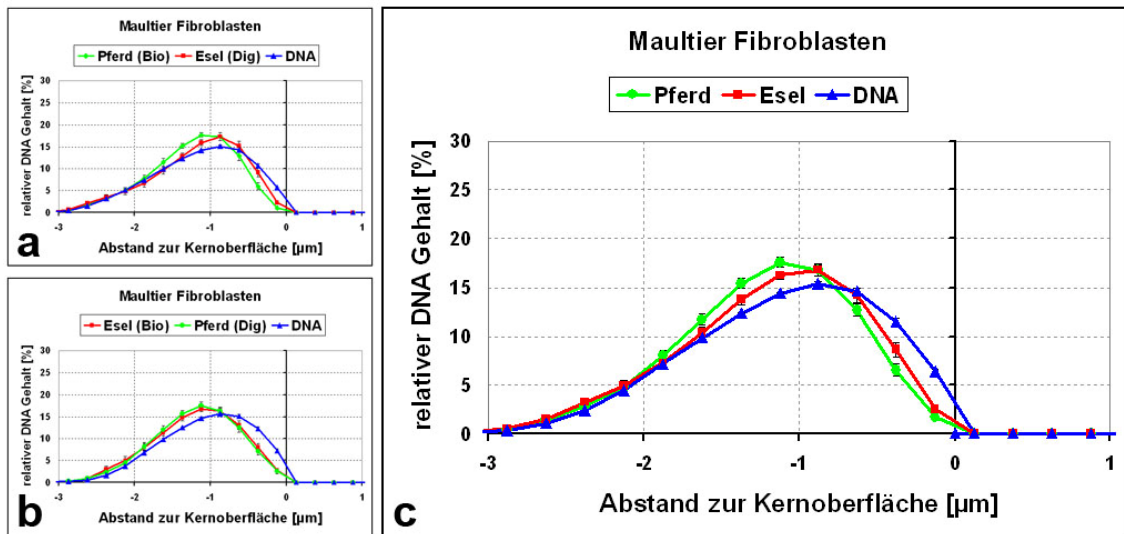


Abb. 57: Radiale Verteilung der parental Genome in Maultier-Fibroblasten. Das große Diagramm (c) ist die Zusammenfassung der beiden Experimente mit reziproker Sondenmarkierung (a, b). Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung des Mittelwerts dar.

Die beiden Experimente mit reziproker Sondenmarkierung zeigen eine sehr ähnliche Verteilung von Pferd- und Eselsignalen im Zellkern (Abb. 57). Die Signale sind im Vergleich zur Kerngegenfärbung leicht nach innen verschoben. Die Zusammenfassung zeigt die Auswertung beider Ansätze in einem Graphen. Mit dem Wilcoxon-Signed-Rank-Test (siehe 2.8.2) wurde anhand der Mittelwerte die Verteilungen der beiden Signale pro Zellkern paarweise verglichen. Es handelt sich dabei nicht um die Werte aus denen die jeweiligen Graphen erstellt wurden, da diese für eine solche Berechnung nicht verwendet werden können. Für die Einzelwerte von Pferd und Esel ergibt sich ein p-Wert von 0,095 und somit kein signifikanter Unterschied in der Signalverteilung. Jedoch unterscheidet sich die Verteilung beider Signale jeweils hoch signifikant von der Gegenfärbung des Kerns ($p < 0,001$).

Radiale Verteilung in Lymphozyten

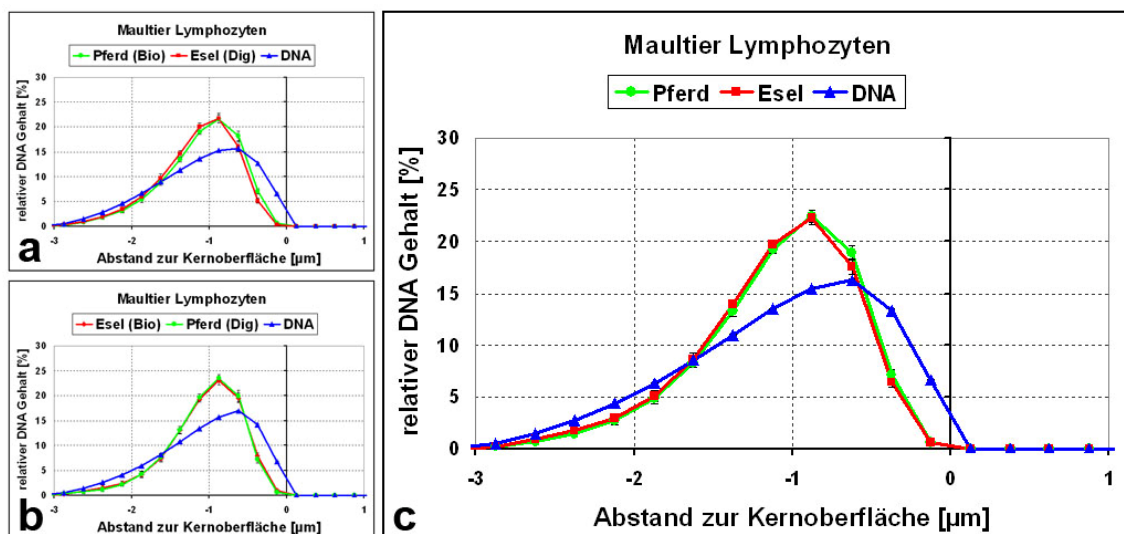


Abb. 58: Radiale Verteilung der parental Genome in Maultier-Lymphozyten. Das große Diagramm (c) ist die Zusammenfassung der beiden Experimente mit reziproker Sondenmarkierung (a, b). Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung des Mittelwerts dar.

Lymphozyten weisen eine den Fibroblasten sehr ähnliche Verteilung der Kerngegenfärbung auf (Abb. 58). Das liegt an einer vergleichbaren Höhe der beiden Zelltypen in z-Richtung, von durchschnittlich 8 μm bei Fibroblasten und 9,4 μm bei Lymphozyten. Die Durchschnittshöhe der Zellkerne wurde aus den einzelnen Bildstapeln gemittelt. Im zusammenfassenden Diagramm sind die Verteilungskurven der Signale von Pferd und Esel fast deckungsgleich und im Vergleich zur Gegenfärbung wiederum etwas nach innen versetzt. Mit dem Wilcoxon-Signed-Rank-Test unterscheiden sich die Werte der Gegenfärbung signifikant von denen des Esels ($p = 0,04$), nicht jedoch von denen des Pferds ($p = 0,768$).

Zunächst verwunderlich ist der p-Wert von 0,021 für den Vergleich der Einzelwerte von Esel- und Pferdesignalen. Dies würde bedeuten, dass sich die Verteilungen signifikant unterscheiden, obwohl der Graph eine fast identische Verteilung zeigt. Dieser p-Wert lässt sich jedoch erklären, wenn man die gewichteten Mittelwerte der beiden Signale für die 46 einzelnen Kerne miteinander vergleicht. Die Einzelwerte wurden aus dem EDMT-Ergebnisfile (siehe beigelegte CD) entnommen und sind hier nicht gezeigt. Im Gegensatz zu den Fibroblasten ergibt sich bei den Lymphozyten durch Subtraktion der Einzelwerte ein unausgewogenes Verhältnis negativer und positiver Werte. In der Mehrheit der Fälle, nämlich in 29 von 46 Kernen, liegt das Eselsignal durchschnittlich weiter außen, während in nur 17 Kernen die Signale des Pferds weiter außen liegen. Aus diesem Ungleichgewicht von Einzelwerten ergibt sich der unerwartete p-Wert. Mittelt man die einzelnen Werte der Subtraktion, so ergibt sich rechnerisch ein Betrag von ca. 25 nm. Das bedeutet, dass sich die Verteilung von Pferd- und Eselsignalen durchschnittlich nur um 25 nm unterscheidet, weshalb das Testergebnis in diesem Fall biologisch nicht relevant ist.

Radiale Verteilung subtrahierter Signale

Da es bei den verwendeten Sonden zu Kreuzhybridisierungen kommen kann (siehe 3.4.1), wurden die Signale von Esel und Pferd innerhalb eines Kerns jeweils voneinander abgezogen (siehe 2.6.1 und Abb. 59) und die radiale Verteilung anschließend erneut berechnet (Abb. 60).

In den Fibroblasten unterscheidet sich die Verteilung von Pferd- und Eselsignalen nicht signifikant ($p = 0,342$), auch wenn der Graph eine leichte Verschiebung der Pferdesignale ins Kerninnere zeigt. Sowohl Pferd- ($p < 0,001$) als auch Eselsignale ($p = 0,003$) unterscheiden sich hochsignifikant von der Verteilung der Gegenfärbung.

Auch in den Lymphozyten ist die Verteilung maternaler und paternaler Signale sehr ähnlich ($p = 0,776$). Sowohl Pferd- ($p = 0,06$) als auch Eselsignale ($p = 0,162$) unterscheiden sich in diesem Fall nicht signifikant von der Verteilung der Gegenfärbung.

Die Verteilungen der subtrahierten Signale entsprechen denen der Originalsignale. Kreuzhybridisierung von Esel- und Pferdesonden wirkt sich demnach nicht maßgeblich auf die Ergebnisse der radialen Verteilung aus.

Unterschiedliche radiale Verteilungsmuster von Pferd- und Eselsignalen innerhalb von Maultier-Fibroblasten und -Lymphozyten konnten nicht festgestellt werden. Wie bereits anhand von 2D-FISH Präparaten vermutet (siehe 3.4.2), unterscheidet sich die Anordnung maternaler und paternaler DNA nicht.

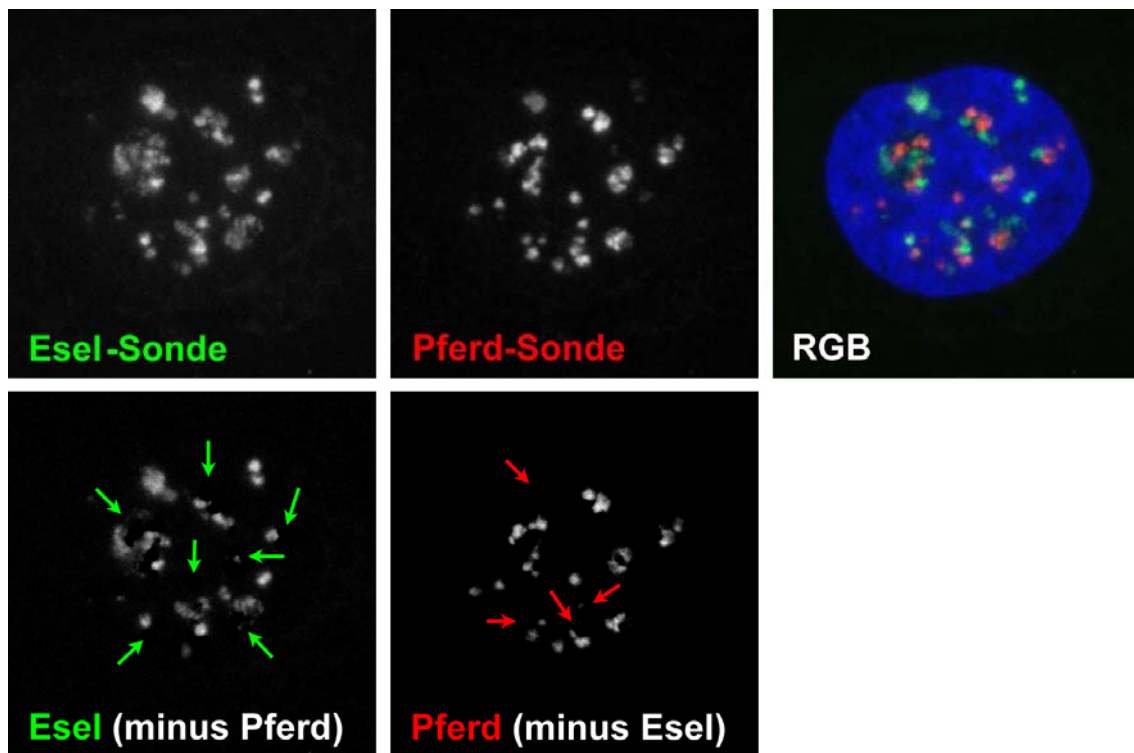


Abb. 59: Beispiel für die gegenseitige Subtraktion der Bildstapel bzw. der Signale von Pferd und Esel in einem Maultier-Fibroblasten. Es sind ausschließlich Projektionen dargestellt. Die obere Reihe zeigt die aufgenommenen Originalsignale einschließlich aller Kreuzhybridisierungssignale. Die untere Reihe zeigt die gleichen Signale abzüglich des jeweils anderen Farbkanals. Übrig bleiben Signale, die ausschließlich vom Esel oder vom Pferd stammen. Grüne und rote Pfeile markieren Bereiche, in denen durch die Subtraktion Signale verschwunden sind.

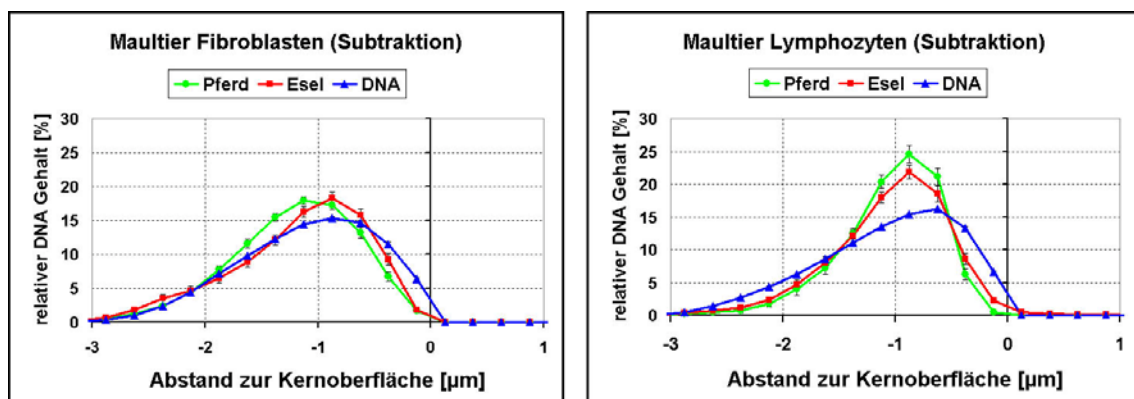


Abb. 60: Radiale Verteilung der parental Genome in Maultier-Fibroblasten (links) und -Lymphozyten (rechts) nach Subtraktion der Farbkanäle (siehe Abb. 59). Bei beiden Diagrammen handelt es sich um die Zusammenfassungen der beiden reziproken Markierungsansätze. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung des Mittelwerts dar.

3.4.3.2 Gleichmäßige Verteilung maternalen und paternalen Chromosomen während der Mitose

Bei maternalen und paternalen Interphasechromosomen finden sich keine Hinweise auf eine nicht-zufällige Verteilung im Zellkern (siehe 3.4.3.1). Mit der Markierung repetitiver Sequenzen sind in der Interphase keine einzelnen Chromosomen erkennbar. In Prophasenuklei jedoch kondensieren die Chromosomen, zunächst ohne ihre relative Position innerhalb des Kerns zu verändern. Durch Markierung der Zentromere ist es nun möglich, vollständige Esel- und Pferdechromosomen und ihre Anordnung zueinander zu identifizieren. Fibroblastenkerne sind dafür besonders geeignet, da ihre im Vergleich zu Lymphozyten geringe Höhe die Probleme der Auflösung entlang der optischen Achse mindert. Deshalb wurde die Anordnung der elterlichen Chromosomen in dreidimensional erhaltenen Mitosen von Fibroblasten untersucht. Dazu wurden rund 30 Mitosen in verschiedenen Stadien mit dem LSM aufgenommen (Abb. 61). Dabei muss bedacht werden, dass sich die ohnehin wenigen mitotischen Zellen während der Fixierung und der anschließenden FISH besonders leicht vom Präparat ablösen, da sie sich abrunden und dadurch weniger stark am Substrat haften. Die Zahl mitotischer Zellen auf einem Präparat ist deshalb stark begrenzt.

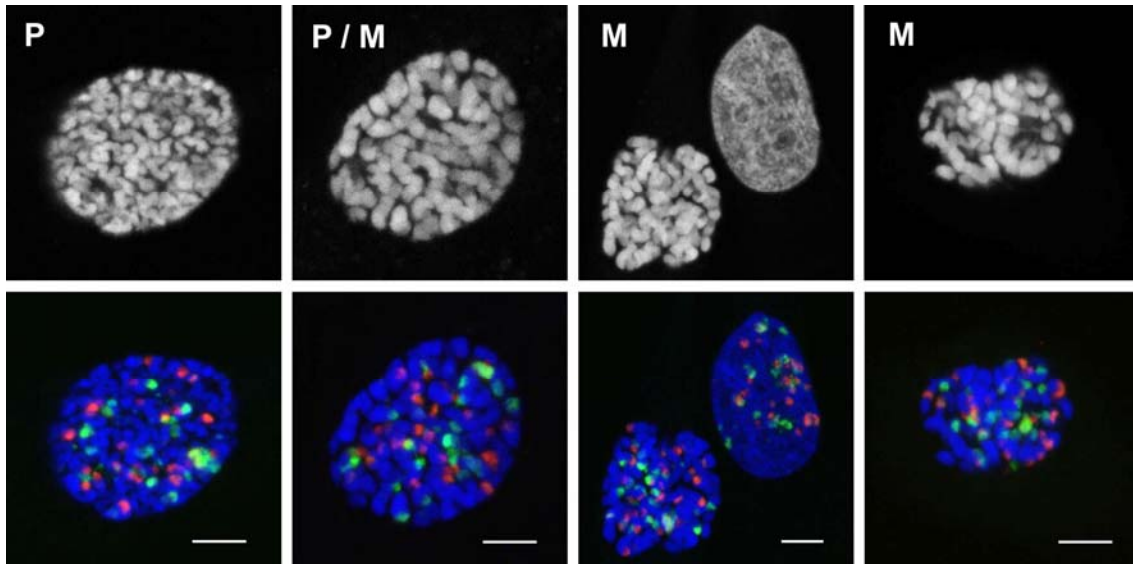


Abb. 61: Projektionen von 3D-FISH auf Maultier-Fibroblasten in Mitose. P stellt eine Prophase, P/M den Übergang zwischen Prophase und Metaphase (Prometaphase) und M zwei frühe Metaphasen dar. Zum Vergleich enthält eine der Abbildungen auch einen Interphasekern. Die Pferde-sonde ist rot und die Eselsonde grün dargestellt, blau zeigt die DAPI-gefärbte DNA. Maßstab: 5 μ m.

Drei Mitosen wurden exemplarisch mit der Software *AMIRA* (siehe 2.6.2) dreidimensional rekonstruiert (Abb. 62, Dateien siehe beigelegte CD). Homologe Chromosomensätze nehmen auch in den Mitosen kein erkennbares Verteilungsmuster ein. Maternale und paternale Signale erscheinen gleichmäßig verteilt. Dies spricht erneut für eine zufällige Durchmischung der Chromosomen unterschiedlicher Herkunft.

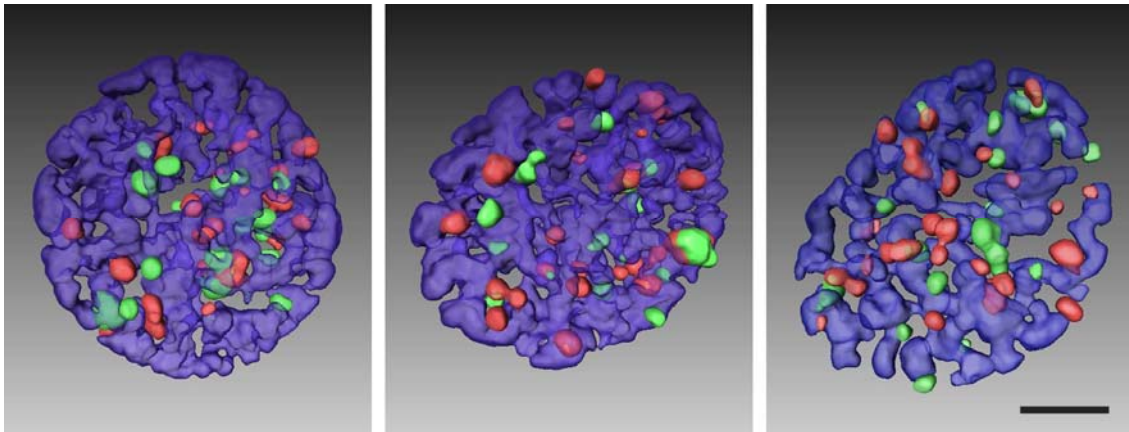


Abb. 62: Beispiele für dreidimensional rekonstruierte Mitosen von Maultier-Fibroblasten, wobei die beiden rechten Abbildungen zwei der Projektionen aus Abb. 61 entsprechen. Maßstab: 5 μ m.

3.4.3.3 Zentromere beider parental Genome bilden gemeinsame Cluster

Beim Betrachten der Projektionen von Maultierkernen fällt auf, dass maternale und paternale Signale in Fibroblasten und Lymphozyten überlappen (Abb. 63), was ein weiteres Indiz für eine gleichmäßige Verteilung der beiden Genome unterschiedlicher Herkunft ist.

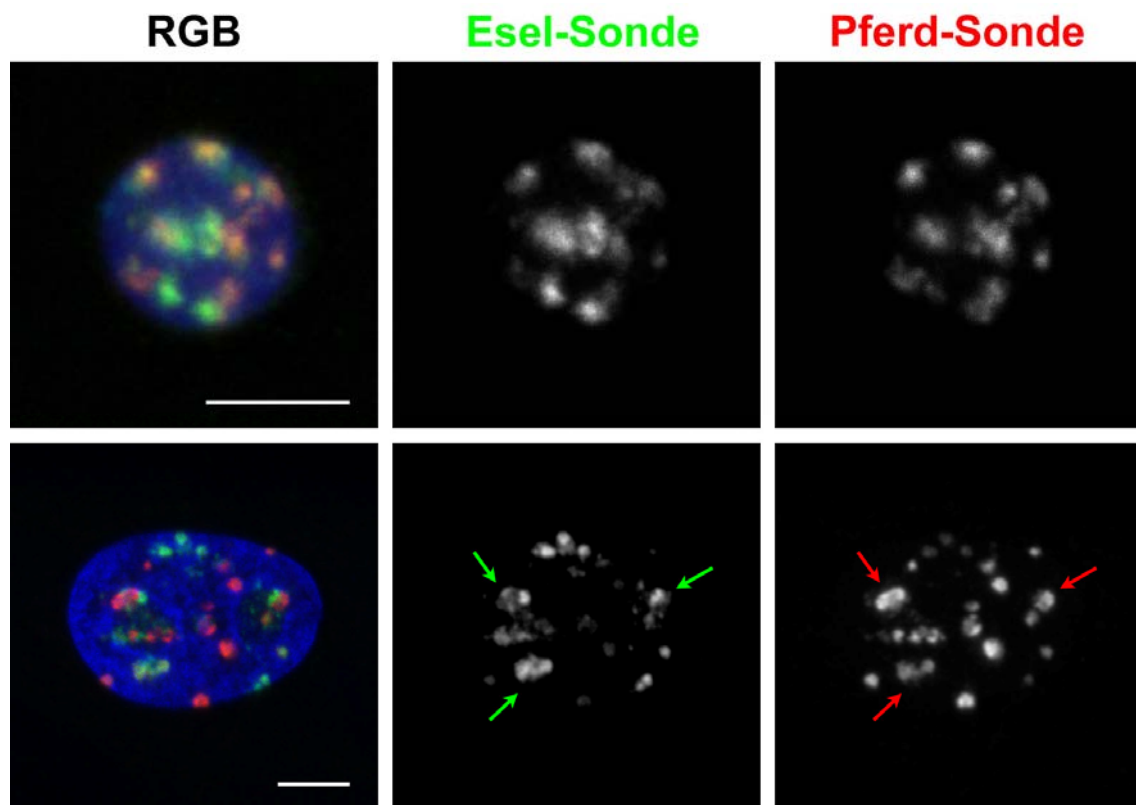


Abb. 63: Zentromere der beiden elterlichen Genome bilden gemeinsame Chromozentren in Maultierzellen. Lymphozyten (obere Reihe) besitzen wenige, dafür aber größere Cluster der Pferd- und Esel-Sonde als Fibroblasten (untere Reihe). Aber auch in Fibroblasten überlagern zahlreiche Signale deutlich (grüne und rote Pfeile). Bei den Abbildungen handelt es sich um Projektionen, Maßstab: 5 μ m.

Mit den Sonden für Pferd- und Esel-DNA werden hauptsächlich repetitive Sequenzen nachgewiesen, insbesondere Zentromere (siehe 3.4.1). Wenige bis viele Zentromere können sich zu reversiblen, übergeordneten Strukturen, sogenannten Chromozentren, zusammenlagern (Weierich 2003). Die Wahrscheinlichkeit einer Vermischung homologer Signale ist u.a. abhängig von der Zahl beteiligter Zentromere innerhalb eines Chromozentrums. Je mehr Zentromere sich zusammenlagern, desto größer die Cluster und desto höher die Wahrscheinlichkeit, dass es bei einer zufälligen Verteilung zu einer Vermischung paternaler und maternaler DNA kommt. Da Maultierlymphozyten im Schnitt weniger, dafür aber größere Chromozentren besitzen, wie es auch für Mauszellen beschrieben wurde (Mayer 2005), kommt es hier häufiger zu einer Überlappung von unterschiedlichen Signalen als in Fibroblasten mit mehreren kleinen Chromozentren.

Tabelle 12 gibt einen Überblick bezüglich der Clusterzusammensetzung in Maultier-Lymphozyten und -Fibroblasten. Die Cluster wurden in drei Größenklassen (klein, mittel, groß) und die Art ihrer enthaltenen Signale (von „Pferd und Esel“, „nur Pferd“ oder „nur Esel“) eingeteilt. Ein Cluster besteht dann aus beiden Signaltypen, wenn diese nicht nur aneinander grenzen, sondern zumindest partiell überlappen. Die beiden Tabellen enthalten die gemittelten Werte aus je zwei Experimenten mit reziproker Sondenmarkierung.

Zelltyp	Fibroblasten (n = 54)				Lymphozyten (n = 44)			
Signale (Cluster) von:	Esel + Pferd	nur Esel	nur Pferd	Σ	Esel + Pferd	nur Esel	nur Pferd	Σ
groß	33	0	1	34	93	0	0	93
mittel	188	11	37	236	215	22	2	239
klein	208	200	494	902	113	37	6	156
Σ	429	211	532	1172	421	59	8	488
%	36,6	18	45,4	100	86,3	12,1	1,6	100

Tabelle 12: Anzahl und Zusammensetzung der Signalcluster in Fibroblasten und Lymphozyten des Maultiers. Die Werte stellen die Zusammenfassung der beiden Einzelexperimente mit reziproker Sondenmarkierung dar.

Lymphozyten besitzen durchschnittlich 11 (488 in 44 Kernen) und Fibroblasten genau doppelt so viele, nämlich 22 (1172 in 54 Kernen) Signale/Signalcluster pro Zellkern, was in etwa der Anzahl an Chromozentren in diesen Zelltypen bei der Maus entspricht (Mayer 2005).

In Lymphozyten enthalten 86% aller Cluster sowohl Signale vom Pferd als auch vom Esel, in Fibroblasten hingegen sind es weniger als 37%. Die restlichen 14% bzw. 63% bestehen lediglich aus DNA von Pferd oder Esel.

Der Anteil großer Cluster in Lymphozyten ist mit 19% (93 von 488) wesentlich höher als in Fibroblasten mit lediglich 3% (34 von 1172). Umgekehrt ist der Anteil kleiner Cluster mit 77% (902 von 1172) in Fibroblasten wesentlich höher als in Lymphozyten mit 32% (156 von 488). Zusätzlich bestehen in Fibroblasten 77% (694 von 902) der kleinen Cluster aus nur einem Signal, während es nur 28% (43 von 156) in Lymphozyten sind. Das könnte daran liegen, dass Fibroblasten einige besonders kleine Signale besitzen, die evtl. von einzelnen Zentromeren stammen.

3.4.3.4 Repetitive Elemente von Pferd und Esel sind häufig GC-reich

Bereits frühere Arbeiten beschreiben GC-reiche repetitive Sequenzen in Esel (Ryder 1979) und Pferd (Gadi 1983), die einen beträchtlichen Teil des gesamten Genoms repräsentieren. Dabei handelt es sich hauptsächlich um Satelliten-DNA, die in den Zentromeren vieler, jedoch nicht aller, Chromosomen dieser beiden Spezies angereichert ist.

Auch in den 3D-Maultierkernen gibt es Hinweise darauf, dass es sich bei den Signalen von Pferd und Esel häufig um GC-reiche, repetitive Sequenzen handelt. Die DAPI-Gegenfärbung, welche hauptsächlich AT-reiche DNA markiert, ist in diesen Bereichen wesentlich schwächer ausgeprägt. Da sich GC-reiche Satelliten-DNA überwiegend in den Zentromeren befindet, sind einige Chromozentren in der Gegenfärbung ausgespart. In diesen Aussparungen scheinen die GC-reichen Signalcluster zu liegen, während die größeren und deutlicher abgegrenzten Nukleoli frei von Signalen sind (Abb. 64).

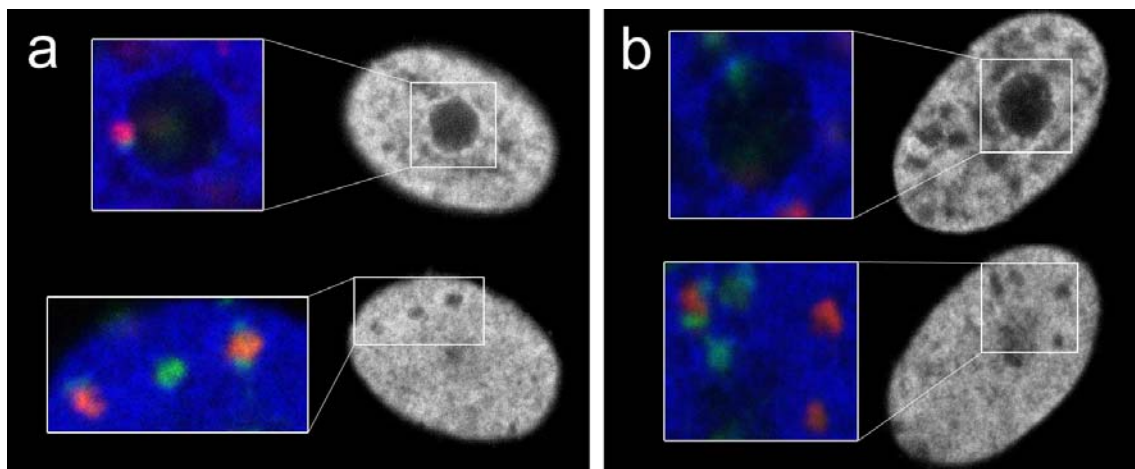


Abb. 64: Zwei verschiedene Fibroblastenkerne des Maultiers (a und b) nach 3D-FISH. Gezeigt ist die DAPI-Färbung (rechts) und ein vergrößerter Teilausschnitt der RGB-Projektion (links) von je zwei Schnittebenen der Kerne. Eselsignale sind grün und Pferdsignale rot dargestellt. Der obere Teil zeigt jeweils einen Nukleolus, der frei von Zentromersignalen ist. Die unten dargestellten Aussparungen in der DAPI-Färbung enthalten Signale von Pferd und/oder Esel. Grund dafür könnte der hohe GC-Gehalt der repetitiven Elemente sein, da DAPI hauptsächlich an AT-reiche Sequenzen bindet.

4 Diskussion

In dieser Arbeit wurden mehrere Modelle der Chromatinorganisation im Zellkern überprüft. Um Aussagen über die Positionierung subchromosomaler DNA-Abschnitte in lebenden Zellen und während der Differenzierung von Zellen treffen zu können, wurde versucht das lac-Operator/lac-Repressor-GFP System in embryonalen Mausstammzellen zu etablieren. Dies gestaltete sich jedoch schwieriger als zunächst angenommen. Anhand dreidimensional fixierter ES-Zellen einer zyklierenden Population und postmitotischer Makrophagen wurde die Positionierung bestimmter Genloci im Zellkern mittels FISH untersucht. Dem Einfluss von Gendichte, Genaktivität und sequenziellen Eigenschaften wie GC-Gehalt und anderen repetitiven Elementen galt dabei das Hauptaugenmerk. In einem dritten Ansatz wurde die Verteilung maternalen und paternalen DNA im Nukleus untersucht. In Hybridzellen des Maultiers konnten die elterlichen Chromosomen mittels FISH getrennt voneinander markiert werden. Dabei sollte Klarheit in die wenigen, jedoch widersprüchlichen Arbeiten zum Thema Genomseparation gebracht werden.

4.1 Keine stabile Etablierung des lac-Operator/lac-Repressor-GFP Systems in murinen ES-Zellen

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, das lac-Operator/lac-Repressor System (Robinett 1996; Belmont 1998) stabil in mES-Zellen zu integrieren (siehe 3.1). In einigen Zelllinien der Maus (Dietzel 2004), des Menschen, Drosophila (Belmont 1989; Belmont 1999) und sogar in Hefe (Straight 1997; Heun 2001) wurde dieses System bereits erfolgreich etabliert. Da der lac-Repressor an GFP gekoppelt ist, ergibt sich die Möglichkeit, Chromatin in vivo zu lokalisieren und Bewegungen über einen längeren Zeitraum z.B. während der Zelldifferenzierung zu verfolgen.

In Zusammenarbeit mit R. Mayer konnte bereits gezeigt werden, dass eine Cotransfektion von Repressor und Operator in ES-Zellen prinzipiell möglich ist (Mayer 2006). Einige Zellen weisen nach der Transfektion ein oder mehrere punktförmige Signale auf. Eine FISH auf Metaphasen dieser Zellen mit den beiden Plasmiden als Sonden, zeigte bis zu vier Integrationsorte pro Plasmid (Abb. 65). Die Mehrheit der Signale colokalisiert dabei, das heißt lac-Repressor und lac-Operator integrieren an der gleichen Stelle in ein Chromosom (Mayer 2006). Eine transiente Transfektion wurde damit ausgeschlossen. Leider konnten diese Zellen nicht erfolgreich subkloniert werden. Anstatt Zellen mit Signalen anzureichern, verloren die Zellkerne ihre Signale nach den Subklonierungsschritten. Ob transfizierte Klone die Fremd-DNA dabei wieder verlieren, indem entsprechende Zellen sich nicht weiter vermehren und/oder der GFP-lac-Repressor nicht mehr exprimiert wird, wurde nicht näher untersucht. Für das eigentliche Ziel, die Etablierung einer stabil transfizierten Zelllinie, war dies nicht weiter relevant. Ein Abschalten des Transgens durch das zelleigene System scheint jedoch wahrscheinlich, da vereinzelt auch in Subklonen ohne sichtbare GFP-Signale im Kern, entsprechende FISH-Signale gefunden wurden.

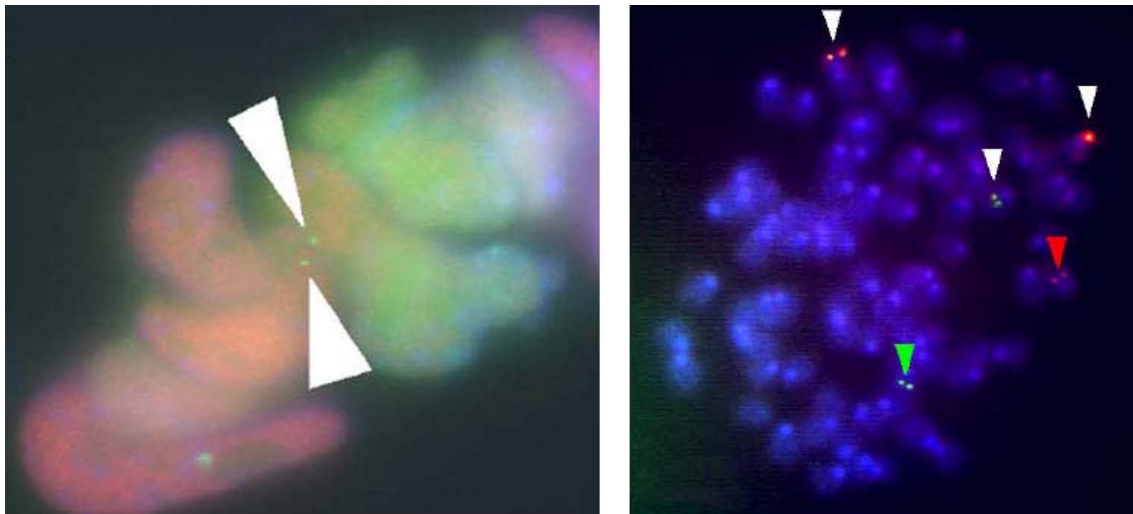


Abb. 65: Ergebnis einer Cotransfektion von ES-Zellen mit einem lac-Repressor (p3'SS YFP, Abb. 15) und lac-Operator Konstrukt (pPS-8.8, Abb. 16 links). Links: Eine kleine ES-Zellkolonie, mit YFP-Punktsignalen (Pfeile) in einzelnen Zellen. Der Kernhintergrund weist eine inhomogene YFP-Färbung auf. Zusätzlich wurden die Zellen mit dem ES-Marker Oct3/4 angefärbt (siehe 2.1.5). Rechts: RGB-Bild einer Metaphasespreitung dieses transfizierten Zellklons. Lac-Repressor (grün) und lac-Operator (rot) wurden als Sonden auf die 2D-Präparate hybridisiert. Auf drei Chromosomen haben sich beide Plasmide an derselben Stelle integriert, da die Signale colokalisieren (weiße Pfeile). Es liegen auch ein lac-Operator (roter Pfeil) und ein lac-Repressor Plasmid (grüner Pfeil) separat in je einem Chromosom vor. Die Abbildung wurde aus der Doktorarbeit von R. Mayer entnommen (Mayer 2006).

In weiteren Ansätzen wurde im Rahmen dieser Dissertation versucht, Operator und Repressor getrennt zu transfizieren. Aber auch diese Versuche brachten nur Teilerfolge. Zwar konnten Zellen mit grüner Hintergrundfluoreszenz des lac-Repressor-GFP isoliert, jedoch wieder nicht erfolgreich subkloniert werden (siehe Abb. 33). Des Weiteren zeigten einige Zellen keine Expression des Stammzellmarkers Oct3/4 mehr (siehe Abb. 34). Scheinbar führte die Transfektion und anschließende Subklonierung zu einem teilweisen Verlust der Pluripotenz von ES-Zellen.

Da auch in einer teilweise parallel durchgeführten Doktorarbeit (Mayer 2006), sowie in Zusammenarbeit mit T. Schroeder (GSF Neuherberg) keine stabile Transfektion von ES-Zellen mit dem lac-Operator/Repressor System möglich war, wurden die Versuche schließlich abgebrochen. Persönliche Kommunikation mit anderen, auf diesem Gebiet erfahrenen Personen, wie z.B. E. Heard (L'Institut Curie, Paris) bestätigte große Schwierigkeiten bei der Transfektion speziell von Stammzellen mit dem GFP-Repressor. Eine stabile Integration mit permanenter Transkription eines ähnlichen GFP-gekoppelten Konstrukts konnte auch in ihrer Arbeitsgruppe bis heute nicht erzielt werden. Grund ist wahrscheinlich eine besondere Sensitivität pluripotenter, embryonaler Zellen gegenüber dem GFP/YFP-Repressor. Allerdings existiert eine stabile ES-Linie mit GFP-gekoppeltem Histon H2B (H2B-GFP). Diese wurde in der Arbeitsgruppe von T. Schroeder hergestellt (Schroeder 2003). Die Zellkerne dieser Linie zeigen eine grüne Färbung des Zellkerns über mehrere Passagen hinweg. Prinzipiell scheint eine dauerhafte Expression von GFP in ES-Zellen möglich zu sein, ohne essentielle Funktionen zu beeinträchtigen. Folglich könnte im lac-Repressor selbst der Grund für das Scheitern des Experiments begründet sein. Im Gegensatz zu den verwendeten Operatorkonstrukten beinhaltet er neben dem Promotor keine eigene Kontrollregion und die Expression ist abhängig vom Ort der Integration. Eventuell wird er in Stammzellen, anders als in anderen Zellen, nicht in entsprechende Bereiche des Genoms wie z.B. das Euchromatin eingebaut und damit auch nicht dauerhaft exprimiert. Oder der

tandemartige Einbau führt zu Rekombinationsvorgängen, die eine Transkription des vollständigen Fusionsproteins verhindern. Letztendlich bleibt ungeklärt, warum eine stabile Integration des lac-Repressor-GFP Konstrukts in ES-Zellen nicht möglich war bzw. welche speziellen Mechanismen der embryonalen Stammzellen dies verhinderten.

4.2 Bestmöglicher Erhalt der 3D-Zellkernstruktur mittels Paraformaldehyd-Fixierung

Sowohl die Konservierung der Chromatinstruktur im Nukleus nach Fixierung mit 4% Paraformaldehyd (PFA) und anschließender Permeabilisierung, als auch die Fixierung mit Methanoleisessig nach hypotoner Behandlung und anschließendem Lufttrocknen (Hypo-MAA) wurde in zahlreichen Arbeiten über Zellkernarchitektur verwendet (siehe 1.3). Die damit erzielten Ergebnisse bezüglich der Anordnung von Chromatin im Allgemeinen und einzelner Genloci im Speziellen werden häufig direkt miteinander verglichen. Ob eine Gleichstellung dieser beiden Methoden sinnvoll ist, welche Artefakte möglicherweise auftreten und welche Methode die tatsächliche Anordnung im Nukleus am besten widerspiegelt, sollte anhand der hier erhobenen Daten endgültig geklärt werden.

Dazu wurde die Kernform und die Morphologie der Chromozentren direkt nach der Fixierung analysiert, sowie die Signale nach der FISH quantitativ gemessen und verglichen. Hypo-MAA-fixierte und damit hypoton behandelte, aufgetropfte und luftgetrocknete Zellkerne zeigten im Rahmen dieser Arbeit mehrere Artefakte. Die Breite der Kerne nahm zu, während ihre Höhe abnahm (siehe 3.2.1). Vergleiche verschiedener Versuchsansätze zeigten, dass dies in erster Linie eine Folge der hypotonen Behandlung und dem anschließenden Auftropfen und weniger der Methanoleisessig-Behandlung selbst zu sein scheint (Otten 2004; Hepperger 2007). Das Abflachen wurde bereits zuvor beschrieben (Kozubek 2000) und spiegelt sich auch im Begriff „2D-FISH“ wider, der für diese Methode verwendet wird (Croft 1999). Des Weiteren wurde die Morphologie und damit die Organisation der Chromozentren, welche in der Maus die subzentromerischen repetitiven Sequenzen enthalten, stark beeinflusst (siehe Abb. 35). FISH-Signale eines BACs zeigten nach beiden Fixierungsmethoden eine ähnliche, kompakte Struktur. Dies könnte an der wesentlich geringeren Signalgröße liegen, wie bereits anhand von Transgenen unterschiedlicher Größe in MEL-Zellen gezeigt wurde (Hepperger 2007). Dagegen wirkten die wesentlich größeren Chromosomenterritorien nach hypotoner Behandlung und MAA-Fixierung aufgelockert und dekondensiert (siehe Abb. 35). Bereits zuvor wurde gezeigt, dass hypotone Behandlung (Kobliakova 2005) und andere Veränderungen der Ionenkonzentration (Belmont 1989) einen negativen Effekt auf den Erhalt der Chromosomenmorphologie haben. Die Verteilung von Histonen und dem Splicingfaktor SC-35 kann sich unter diesen Bedingungen verändern (Hendzel 1997), was für eine Umverteilung von Chromatin spricht. Auch eine Extraktion von Proteinen (Sumner 1973; Fraschini 1981), RNA (Lawrence 1985) und DNA (Raap 1986) wurde beschrieben. In der vorliegenden Arbeit wurden BAC-Signale in Hypo-MAA behandelten Kernen häufiger außerhalb ihres Chromosomenterritoriums gefunden als in PFA-fixierten Kernen. Dieser Unterschied in der Verteilung spricht für ein künstlich induziertes Ausloopen peripherer Regionen aus dem Territorium aufgrund des hypotonen Schocks, der MAA-Fixierung und/oder des Lufttrocknens der Kerne. Außerdem zeigen sowohl Territorien als auch BAC-Signale einen höheren Prozentsatz von Signalen außerhalb des Nukleus, was diese Annahme zusätzlich stützt.

Manche Studien, welche die Zellkernarchitektur in Hypo-MAA-fixierten Präparationen untersuchen, beinhalten zusätzlich einige Beispiele PFA-fixierter Nuklei. Trotz der durch Hypo-MAA-Fixierung induzierten Artefakte, ist die radiale Verteilung von Chromosomenterritorien im Zellkern bemerkenswert stabil (Croft 1999; Bridger 2000; Boyle 2001; Hepperger 2007). Im

Vergleich dazu wird die Positionierung räumlich benachbarter Strukturen zueinander deutlich beeinflusst. Beispielsweise loopt der genreiche MHC-Locus in Methanoleisessig-fixierten Nuklei häufiger aus dem zugehörigen Territorium als in Formaldehyd-fixierten (Volpi 2000). Die gleiche Beobachtung wurde am EDC-Locus gemacht (Williams 2002). Im Gegensatz dazu zeigten einige Regionen mittlerer Gendichte des humanen Chromosoms 11p13 in Hypo-MAA-fixierten Lymphoblasten eine vorzugsweise innere Position im Vergleich zu einer Position am Rand des Territoriums in PFA-fixierten Zellkernen (Mahy 2002b). Dieser Unterschied nahm ab, wenn die Abstände anhand der Territoriengröße normalisiert wurden. Die Autoren vermuteten ein Anschwellen der Territorien in hypoton behandelten, MAA-fixierten Zellen. Eine folgende Studie untersuchte die genreiche Region 11p15 mittels Vergleich beider Fixierungsmethoden. Dabei wurden fünf von neun Bereichen in Hypo-MAA-fixierten Kernen eher am Rand des Territoriums gefunden, während die restlichen vier nach beiden Fixierungen einen ähnlichen Abstand zur Territorienoberfläche aufwiesen (Mahy 2002a). Als Erklärung wurde ein Auflockern oder Dekondensieren des Chromatins an der Oberfläche von Territorien in Hypo-MAA-fixierten Kernen vermutet oder im Gegensatz dazu ein Kondensieren dieser Region aufgrund von Formaldehydfixierung. Die Dislokation war nicht linear und unvorhersehbar: Zwei Bereiche, die in 30% und 28% der PFA-fixierten Kerne außerhalb lagen, wurden in 43% bzw. 72% der Hypo-MAA-fixierten Kerne gefunden (Mahy 2002a). In hypoton behandelten und MAA-fixierten mES-Zellen wurde das *Hoxb1*-Gen häufiger außerhalb des zugehörigen MMU11 gefunden als in Formaldehyd-fixierten Zellen mit vorangegangener Permeabilisierung (Chambeyron 2004).

Die vorliegende und andere Arbeiten führen folglich zu dem Schluss, dass es je nach Fixierungsmethode zu unterschiedlichen Ergebnissen bezüglich der Positionierung subchromosomaler Domänen und einzelner Genloci kommen kann. Die Vergleiche lassen zweifeln, ob hypoton behandelte und Methanoleisessig-fixierte Kerne tatsächlich die in vivo Organisation von Chromatin widerspiegeln. Es scheint eher, als ob sich das Chromatin in Hypo-MAA-fixierten Zellen unvorhersehbar ausbreitet, diese Zerstreuung jedoch auf einen bestimmten Bereich um die ursprüngliche Position beschränkt ist. Da dieser Effekt nicht räumlich gerichtet ist, behalten ganze Chromosomenterritorien ihre relative Position im Kern bei, abgesehen von der Anpassung an die veränderte Kernform.

Möglicherweise ist das Ausmaß der beobachteten Fixierungsartefakte in der „large-scale“-Chromatinstruktur Hypo-MAA-fixierter Zellen von der jeweiligen genomischen Region oder dem Zelltyp abhängig. Es wäre denkbar, dass „offenes“ Chromatin leichter verlagert wird als nicht-exprimierte, kompakte Strukturen. Das untersuchte MMU7 ist nach MMU11 das reichste Chromosom der Maus. Der verwendete BAC ist ebenfalls besonders reich (http://www.ensembl.org). Demnach wäre es möglich, dass genärmere Sequenzen und Territorien geringer ausgeprägte Artefakte aufweisen.

Frühere Studien zeigten bereits eine gut erhaltene Kernmorphologie nach Fixierung mit Paraformaldehyd bezüglich der Verteilung von Zentromeren (Cremer 1993; Kurz 1996) oder von PML-Körperchen (Verschure 1999). Im Rahmen der limitierten Auflösung konventioneller und konfokaler Lichtmikroskopie bleibt die Chromatinstruktur auf diese Weise erhalten (Solovei 2002). Dies konnte auch anhand von in vivo Versuchen mit GFP-markierten Zentromer-Bindeproteinen CENP-B (Shelby 1996), CENP-A (Mahy 2002b) oder Histon-H2B (Kanda 1998) gezeigt werden. Ein Vergleich lebender mit Paraformaldehyd-fixierten Zellen einer Mauszelllinie mit GFP-markiertem Transgen bestätigte kürzlich die Konservierung der dreidimensionalen Struktur durch diese Art der Fixierung (Hepperger 2007). Diese Fixierungsmethode stellt folglich einen Standard dar, gegen den sich andere Methoden messen müssen. Die Ergebnisse von Arbeiten, die eine abweichende Fixierungsmethode, wie beispielsweise Metha-

noleisessig verwenden, müssen deshalb zunächst kritisch betrachtet werden. Besonders bei Schlüssen auf die Feinstruktur von DNA und die Anordnung einzelner Loci in Bezug auf andere Strukturen wie z.B. Chromosomenterritorien muss man stets bedenken, dass es sich um Artefakte handeln könnte. In einer früheren Studie wurde argumentiert, dass Methanoleisessig-fixierte Nuklei eine Projektion der in vivo Situation darstellen und man die wahren Abstände verschiedener Strukturen durch mathematische Korrektur der Messergebnisse ermitteln könne (Yokota 1995). Es scheint jedoch, dass durch Hypo-MAA-Fixierung induzierte Artefakte komplexer sind als ein bloßes Abflachen der Kerne. Dennoch können Ergebnisse aus solchen Nuklei bei direkten Vergleichen nützlich sein, beispielsweise bei Genen vor und nach Induktion. Jedoch sollte man bedenken, dass beide Verteilungsmuster signifikant von der tatsächlichen in vivo Situation abweichen können (Hepperger 2007). Aufgrund dieser Einschränkung ist es ratsam, derartige Experimente in erster Linie auf strukturell konservierten, PFA-fixierten Zellen durchzuführen.

4.3 Genpositionierung in Mauszellen

Um die Regulation eines Genoms zu verstehen ist es wichtig, die dreidimensionale Organisation im Zellkern zu analysieren. In der vorliegenden Arbeit wurde die Position von acht einzelnen Genloci auf vier verschiedenen Chromosomen von embryonalen Stammzellen und Makrophagen der Maus mittels FISH auf Interphasekernen untersucht.

Bereits in früheren Studien wurde die Position ganzer Chromosomenterritorien in verschiedenen Mauszelltypen untersucht und eine gendichte- und größenabhängige (Mayer 2005), sowie zelltypspezifische (Parada 2004; Wiblin 2005) Anordnung gefunden (siehe auch Chromosomenterritorien unter 1.1). Bezüglich endogener Gene, sowie stabil integrierter Transgene, wurde in Mauszellen, ähnlich wie in Zellen anderer Säuger, eine expressionsabhängige Positionierung gefunden (siehe Einleitung).

Die Besonderheit der vorliegenden Arbeit besteht in der Auswahl mehrerer Genloci bezüglich ihrer Eigenschaften auf Sequenzebene. So wurden BACs gewählt, die keine Korrelation zwischen Gendichte und GC-Gehalt aufweisen (siehe Tabelle 10 und Abb. 46), wie es bei einem Großteil der Gene und bei ganzen Mausechromosomen der Fall ist. Stattdessen wurden GC-arme aber genreiche und GC-reiche aber genarme Loci mit einbezogen. Durch Untersuchung einzelner BACs und nicht BAC-Pools, wird ein potentiell vielfältiges Mitteln verschiedener Positionierungseffekte vermieden. Somit ist es möglich, einzelnen Sequenzeigenschaften eine bestimmte Positionierung innerhalb des Nukleus zuzuordnen.

4.3.1 Polare Organisation der Chromosomenterritorien

In Bezug auf das zugehörige Chromosomenterritorium wurde eine eher periphere oder gar externe Position für bestimmte exprimierte Gene oder Gencluster gefunden. Deren Genposition unterschied sich deutlich von nicht-exprimierten Kontrollen (Dietzel 1999; Volpi 2000; Mahy 2002b; Williams 2002). Umgekehrt wurden interne Positionen auch bei exprimierten Genen (Mahy 2002b; Stadler 2004) und transkribierten Bereichen (Verschure 1999) gefunden.

Um die Position der Gene in Bezug auf das zugehörige Chromosomenterritorium zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit der Abstand eines jeden Gensignals mit dem Abstand des Territoriensignals zur Oberfläche des Territoriums verglichen (siehe 3.3.2). Wurden zwei Genloci gemeinsam detektiert, so zeigten sie meist eine dem Territorium sehr ähnliche Verteilung (siehe Abb. 40). Dies war auch dann der Fall, wenn sich die Abstände der untersuchten Genloci zur Kernoberfläche signifikant unterschieden (siehe 3.3.1).

Dieses Ergebnis spricht für eine Polarität der Chromosomenterritorien mit einer nicht-zufälligen Verteilung der Gene. Die Genloci bevorzugen dabei eine bestimmte Subregion der Territorien, welche selbst eine distinkte Position im Kern einnehmen. Eine polare radiale Organisation von Chromosomenterritorien wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen vorgeschlagen (Ferreira 1997; Croft 1999; Sadoni 1999; Saccone 2002; Scheuermann 2004; Küpper 2007).

4.3.2 Der β -Globin-Locus assoziiert mit peripherem, nicht jedoch mit zentromerischem Heterochromatin

Der gut untersuchte β -Globin-Locus wurde bereits in zahlreichen Studien über Kernorganisation beschrieben (Brown 2001; Francastel 2001; Ragoczy 2003; Brown 2006; Ragoczy 2006). In einer Studie über aktivierte, humane T-Zellen wurden 90% der inaktiven β -Globin-Gene in Assoziation mit zentromerischem Heterochromatin gefunden (Brown 2001). Während der erythroiden Reifung wurde eine Bewegung von der Peripherie zum Kernzentrum beobachtet (Ragoczy 2006). Francastel et al. (2001) beschrieben für MEL-Zellen ein Binden des unexprimierten β -Globin-Locus an Chromozentren, während eine andere Studie derselben Gruppe dies nicht bestätigen konnte (Ragoczy 2003). Ein Transgen mit regulatorischen Elementen des β -Globin-Locus in MEL-Zellen kolokalisierte ebenfalls nicht mit Chromozentren (Dietzel 2004).

In der vorliegenden Arbeit wurde keine überdurchschnittlich häufige Assoziation des β -Globin-Locus mit den Chromozentren beobachtet (siehe 3.3.1). Eine bevorzugte Positionierung des unexprimierten β -Globin-Locus an zentromerisches Heterochromatin könnte folglich eine Besonderheit einiger Zelltypen sein. Besonders in ES-Zellen war der β -Globin-Locus häufig am Kernrand zu finden, eingebettet in peripheres Heterochromatin (siehe 3.3.1). Die radiale Position ist dabei, wie bei den meisten anderen untersuchten Genloci auch, nicht deterministisch. In unreifen, erythroiden Differenzierungsstadien fetaler Mausleber wurde β -Globin ebenfalls in der Peripherie gefunden (Ragoczy 2006). Es ist deshalb denkbar, dass der β -Globin-Locus in Nicht-Tumorzellen vor seiner Aktivierung generell in der Kernperipherie liegt.

4.3.3 Position des stammzellspezifischen Transkriptionsfaktors Oct3/4 in Bezug auf das Chromosomenterritorium

Der Transkriptionsfaktor Oct 3/4 wird in ES-Zellen exprimiert und bald nach der Differenzierung dauerhaft abgeschaltet (Rosner 1990; Scholer 1990; Niwa 2000). In 2D-FISH Experimenten mit luftgetrockneten Nuklei wurde das Oct3/4-Gen in humanen Lymphoblastoiden durchschnittlich 0,03 μm innerhalb der Grenzen des Territoriums gefunden, während es in humanen ES-Zellen 0,15 μm außerhalb lag (Wiblin 2005). Dieser Unterschied in der Positionierung ist jedoch äußerst gering und deshalb kritisch zu beurteilen. Eine Studie mit morphologisch konservierten Zellen fand den Oct3/4-Locus in 70% der untersuchten undifferenzierten, menschlichen ES-Zellen auf ausgedehnten Chromatinschleifen, weg vom zugehörigen Chromosomenterritorium. In den differenzierten hES dagegen befand er sich in der Peripherie der Territorien (Bartova 2008).

Ein solches „Ausloopen“ von Oct3/4 konnte im Rahmen dieser Arbeit anhand des Vergleichs von murinen ES-Zellen und Makrophagen nicht bestätigt werden. In beiden Zelltypen war die Verteilung der Abstände von Oct3/4 ähnlich der des Territoriums selbst (siehe 3.3.2).

Der Grund für die Unterschiede in der Oct3/4-Positionierung innerhalb des Territoriums bei Mensch und Maus ist nicht bekannt. Möglicherweise hat die unterschiedliche Expression benachbarter MHC Klasse I Genregionen in Mauszellen und menschlichen Zellen einen Einfluss

auf die Positionierung (Wiblin 2005), sowie andere Unterschiede zwischen humanen und murinen ES-Zellen (Übersicht s. Koestenbauer 2006).

4.3.4 Radiale Positionierung der Genloci in Abhängigkeit von Zelltyp und Expression

Bereits in einer früheren Studie konnte eine bevorzugte radiale Position von Chromosomenterritorien im Zellkern in Abhängigkeit vom Zelltyp gezeigt werden (Mayer 2005). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass das auch für individuelle Genloci zutrifft (siehe 3.3.3). Diese zelltypspezifische Positionierung von Genen scheint mehr als eine einfache Folge der Neuordnung entsprechender Chromosomenterritorien zu sein, da beispielsweise zwei Genloci eines Chromosoms in verschiedenen Zelltypen sehr unterschiedliche radiale Positionen im Kern einnehmen können (siehe 3.3.3). Wahrscheinlich finden intrachromosomale Umordnungen statt, die diese Beobachtungen erklären. Das würde auch mit der Beobachtung übereinstimmen, dass Genloci bestimmte Subregionen eines Territoriums einnehmen (siehe 4.3.1).

Zwar wurde keine direkte Korrelation zwischen Genposition der Loci und (Stärke ihrer) Expression gefunden, jedoch findet man die äußersten Positionen bei den beiden Regionen mit der geringsten oder gar keiner Transkription (siehe 3.3.6). Diese Beobachtung stimmt mit Arbeiten überein, die eine periphere Position inaktiver im Vergleich zu aktiven Genbereichen beschreiben (siehe Einleitung). Zu einem anderen Ergebnis kommen einige Studien über humane endogene Loci, die keine solche Korrelation feststellen konnten (Murmann 2005; Küpper 2007; Meaburn 2008). Die Ursache für diese Diskrepanz bleibt unbekannt. Sie könnte in Unterschieden zwischen humanen und murinen Zellen begründet sein.

Viele aktive Gene kolokalisieren mit Splicing Speckles im Zellkern (Huang 1996; Lamond 2003; Shopland 2003; Takizawa 2008). In der vorliegenden Arbeit sollte die Assoziation von Speckles mit dem Oct3/4-Gen in undifferenzierten und differenzierten ES-Zellen, sowie terminal differenzierten Makrophagen untersucht werden (siehe 3.3.7). Dies erwies sich jedoch als schwierig, da die ES-Zellen (im Vergleich zu den Makrophagen und anderen Zellen) ein sehr ungewöhnliches Specklemuster zeigen. Es besteht aus sehr feinen punktförmigen Signalen (siehe Abb. 39). Diese interessante Beobachtung wurde in unserer Arbeitsgruppe unabhängig davon auch bei anderen (nicht-embryonalen) Stammzellen gemacht. Eventuell handelt es sich hierbei um ein stammzelltypisches Muster.

4.3.5 Genpositionierung in Abhängigkeit lokaler genomischer Eigenschaften

Zwei grundlegende Sortierungsprinzipien von Chromosomenterritorien in Nuklei von Säugern und Vögeln wurden bereits beschrieben: Größe und Gendichte (Übersicht s.: Cremer 2001b; Foster 2005; Sproul 2005; Cremer 2006b; Misteli 2007). Neusser et al. (Tanabe 2002) untersuchten homologe Sequenzen auf großen und kleinen Chromosomen unterschiedlicher Spezies. In Fibroblastennuklei mit größenabhängiger Sortierung wurde die Verteilung dieser kleineren homologen Chromosomen nicht konserviert, sondern wandelte sich in Übereinstimmung mit der veränderten Größe. Dies spricht stark gegen eine funktionelle Rolle größenkorrelierter Positionierung. Möglicherweise ist die Sortierung nach Größe eine einfache Folge mechanischer Kräfte und räumlicher Einschränkung der Bewegung mitotischer Chromosomen (Habermann 2001). Im Gegensatz dazu bleibt gendichteabhängige Positionierung chromosomaler Abschnitte in Translokationschromosomen (Croft 1999; Tanabe 2002; Murmann 2005) häufig erhalten, was für eine funktionelle Rolle dieses Verteilungsmusters spricht.

In einer vorangegangenen Studie (Mayer 2005) wurde für Chromosomenterritorien der Maus eine Korrelation der Gendichte mit einer Position im Inneren des Nukleus festgestellt. Andere Arbeiten beschreiben eine solche Korrelation der Chromosomenterritorien in humanen und Primaten-Zellen (siehe 1.1, Chromosomenterritorien). Neuere Studien humaner Zellen finden einen Zusammenhang zwischen der radialen Position von Genloci und der lokalen Gendichte eines 2 Mb oder 10 Mb Fensters um den Locus (Murmman 2005; Küpper 2007). In der vorliegenden Arbeit konnte weder für ES-Zellen noch für Makrophagen der Maus ein Zusammenhang zwischen Genposition und Gendichte gefunden werden (siehe 3.3.4).

Ganz allgemein kann von einer deutlichen Korrelation der Gendichte mit einem hohen GC-Gehalt ausgegangen werden (Bernardi 2000; Waterston 2002), so wie es auch für ganze Mauschromosomen der Fall ist ($R = 0,85$ für Autosomen). Bei den in dieser Arbeit untersuchten Genloci trifft das jedoch nicht zu (siehe 3.3.4 und 3.3.5). Hier kann zwischen Gendichte und GC-Gehalt unterschieden werden. Dabei korreliert die Genposition im Zellkern nicht mit der Gendichte, wohl aber mit dem GC-Gehalt und einigen repetitiven Elementen wie beispielsweise LTR-Elementen und LINEs. Dieses Ergebnis führt zu der Annahme, dass die in früheren Studien beschriebene, gendichteabhängige Position von Loci und Territorien lediglich ein Nebeneffekt der Positionierung aufgrund anderer Eigenschaften ist.

Ergebnisse von Bernardi und Mitarbeitern (Federico 2006) lassen vermuten, dass ein hoher GC-Gehalt eher eine evolutionäre Folge der internen Lokalisation ist, als dessen Ursache: In warmblütigen Vertebraten befinden sich GC-reiche Sequenzen des Genoms in zentralen Bereichen des Nukleus (Bernardi 2000; Saccone 2002; Federico 2004; Federico 2005). Verglichen mit kaltblütigen Vertebraten besitzen warmblütige Vertebraten hauptsächlich in genreichen Abschnitten des Genoms einen erhöhten GC-Gehalt, nicht jedoch in genarmen. Das dient wahrscheinlich der thermodynamischen Stabilisierung von Genstrukturen, welche in vielen Geweben transkribiert werden, durch die Erhöhung der Bindungskräfte zwischen den DNA-Einzelsträngen (Jabbari 2004). Kaltblüter besitzen keinen erhöhten GC-Gehalt. Hybridisiert man jedoch GC- und genreiche DNA-Sonden des Huhns beispielsweise auf Zellkerne eines Frosches oder einer Eidechse, so befinden sich die homologen Regionen ebenfalls im Inneren des Nukleus (Federico 2006). Eine Zunahme des GC-Gehalts könnte speziell den Genen einen selektiven Vorteil verleihen, welche in vielen verschiedenen Zelltypen exprimiert werden. Dagegen könnte dieser Vorteil bei Genen, die wie β -Globin oder benachbarte olfaktorische Rezeptorgene in nur einem bestimmten Zelltyp exprimiert werden (Bulger 1999), wesentlich schwächer oder gar nicht vorhanden sein. Das könnte ein Grund dafür sein, dass die Korrelation von GC-Gehalt und Gendichte nicht perfekt ist. Dabei sollte bedacht werden, dass alle Werte für Gendichte zum jetzigen Zeitpunkt als vorläufig betrachtet werden müssen. Die meisten protein-codierenden Gene im Genom von Maus und Mensch wurden bereits beschrieben. Studien über *C. elegans* vermuten jedoch eine mindestens ebenso große, wenn nicht gar größere Zahl an Genen, welche für andere Arten von RNA kodieren (Cheng 2005; Ruby 2006). Solche RNAs, wie beispielsweise miRNAs, können wichtige regulatorische Funktionen in unterschiedlichen Zelltypen übernehmen (Williams 2008). Über die genaue Anzahl und potentielle chromosomale Lokalisation solcher RNA-Gene in Vertebraten kann lediglich spekuliert werden.

Ähnlich dem GC-Gehalt könnten LTR- und LINE-Elemente eine Folge der Akkumulation oder besseren Konservierung solcher Sequenzen im Laufe der Evolution sein. Sie wären demnach zwar mit speziellen Eigenschaften, wie „offenem“ und „geschlossenem“ Chromatin assoziiert, jedoch weniger an der Positionierung im Kern beteiligt. Dennoch könnten sich sowohl der GC-Gehalt als auch bestimmte repetitive Elemente als wichtige Indikatoren für die Positionierung im Kern herausstellen. In diesem Zusammenhang muss jedoch auch erwähnt werden, dass der beste von uns gefundene Indikator für die durchschnittliche radiale Genpositionierung in

Makrophagen die Positionierung in ES-Zellen ist und umgekehrt. Diese starke Korrelation der Genpositionierung in eher entfernt verwandten Zelltypen spricht für weitere, noch unbekannte Eigenschaften des Chromatins, die eine wichtige Rolle spielen.

4.3.6 Interaktionsmodell der Positionierung von Chromatin im Zellkern

Erst kürzlich zeichnete sich ein zusätzliches Prinzip der Chromosomenverteilung in Säugernuklei ab. Während erste Berichte über bevorzugte Nachbarschaften unterschiedlicher Chromosomenregionen in bestimmten Zelltypen bereits 15 Jahre alt sind (Arnoldus 1989), zeigen zahlreiche neuere Studien, dass eine bevorzugte Nachbarschaft von Chromosomen und Sequenzen weiter verbreitet ist als bisher angenommen (Pombo 1998; Nikiforova 2000; Shopland 2003; Osborne 2004; Parada 2004; Spilianakis 2004; Bacher 2006; Brown 2006; Lomvardas 2006; Simonis 2006; Wurtele 2006; Xu 2006) (Übersicht s. Lanctôt 2007a; Misteli 2007). Auch wenn die Kolokalisation ähnlich regulierter Gene auf unterschiedlichen Chromosomen alles andere als ubiquitär ist (Brown 2006; Lanctôt 2007b), handelt es sich bei den bisher entdeckten Interaktionen wahrscheinlich nur um die Spitze des Eisbergs.

Viele chromosomale Bereiche wie Gene oder Regulatoren haben bevorzugte Interaktionspartner (Simonis 2006), wie beispielsweise Splicing Speckles (Shopland 2003), Polycomb (Saurin 1998) - oder andere Kernkörperchen (Spector 2006), sowie sogenannte Transkriptionsfabriken, an die bestimmte Transkriptionsfaktoren binden (Osborne 2004; Bartlett 2006). Sie teilen sich diese Interaktionspartner mit anderen chromosomalen Abschnitten, welche ebenfalls eine bevorzugte Bindung mit diesen Kernstrukturen eingehen. Solche Interaktionen mit bevorzugten Partnern könnten eine treibende Kraft in der Positionierung von chromosomalen Regionen und Territorien innerhalb des Zellkerns sein (Übersicht s. Misteli 2007).

In einem daraus entwickelten Modell (Manuskript von S. Dietzel in Vorbereitung) dient diese Idee auch zur Erklärung der radialen Anordnung von Chromatin im Zellkern. Bevorzugte Interaktionen mit bestimmten Bereichen anderer Chromosomen oder mit Strukturen, die von mehreren Chromosomen geteilt werden, führen zu einer gegenseitigen Anlagerung von Chromosomenterritorien. Interaktionen, die zu einem Abschalten der Gene führen, haben eine Positionierung an der Kernperipherie (Weierich 2003; Zink 2004; Williams 2006; Malhas 2007; Meaburn 2007a; Neusser 2007) oder eine Assoziation mit zentromerischem Heterochromatin (Brown 1997; Brown 2001; Brown 2006) zur Folge, ganz im Gegensatz zu aktivierenden Interaktionen. Je weniger Kontakt ein Territorium mit der Kernperipherie hat, desto mehr Möglichkeiten für aktivierende Interaktionen gibt es. Deshalb ist die Wahrscheinlichkeit, dass ein Chromosom im Zentrum des Nukleus zu liegen kommt umso höher, je mehr Interaktionen es mit anderen Territorien oder gemeinsamen Kernkörperchen eingeht. Demnach spielt der epigenetische Status bei der Positionierung im Zellkern eine wichtige Rolle. Dabei sind „aktivierende“ Interaktionen nicht auf exprimierte proteinkodierende Gene beschränkt, da ein „Öffnen“ des Chromatins in großem Umfang auch in Abwesenheit von Transkription möglich ist (Tumbar 1999). Dieses Modell geht davon aus, dass Gene und Genregulatoren im Durchschnitt mehr aktivierende Interaktionen eingehen als andere DNA-Sequenzen. Folglich ist die Wahrscheinlichkeit für genreiche Chromosomenterritorien, im Zentrum des Zellkerns zu liegen zu kommen sehr hoch. Im kleinen Maßstab ist diese Korrelation von Gendichte und vielen „aktivierenden“ Interaktionen nicht zwangsläufig gegeben. Der β -Globin-Locus bietet ein Beispiel für die Abwesenheit einer solchen Korrelation auf lokaler Ebene. Zwar ist dieser Locus sehr genreich, jedoch handelt es sich bei den Genen entweder um Globingene oder olfaktorische Rezeptoren, die in den meisten Zelltypen nicht benötigt werden. Dementsprechend wurde der β -Globin-Locus in der Kernperipherie gefunden.

In diesem Modell wären Verteilungsmuster im Zellkern wie beispielsweise räumliche Verteilung GC-reicher und -armer Sequenzen (Bernardi 2000; Saccone 2002; Federico 2006), repetitiver DNA (Hsu 1971; Weierich 2003; Mayer 2005) und bestimmter Replikationsmuster (O'Keefe 1992) eine Folge der Positionierung von Chromosomen und chromosomaler Subregionen aufgrund von Interaktionen.

4.4 Keine parentale Genomseparation in Maultierzellen

Ziel dieses Teils der vorliegenden Arbeit war es, die Theorie der parentalen Genomseparation entweder zu untermauern oder zu widerlegen. Bis dato gab es diesbezüglich nur sehr wenige Studien und keinerlei dreidimensionale Untersuchungen an Säugerzellen, da normalerweise eine Unterscheidung väterlicher und mütterlicher Chromosomen nicht möglich ist. Eine Ausnahme stellen hybride Organismen wie das Maultier (*E. caballus* × *E. asinus*) dar. Mittels 3D-FISH wurde die Verteilung maternaler und paternaler Chromosomen in Maultier-Fibroblasten und -Lymphozyten untersucht. Gesamtgenomische Sonden von Pferd (*E. caballus*) und Esel (*E. asinus*) wurden sowohl auf Interphasekerne als auch auf Prometaphasechromosomen hybridisiert und konnten getrennt voneinander nachgewiesen werden (siehe 3.4.3). Die dabei gewonnenen Erkenntnisse über die Anordnung der beiden Genome innerhalb eines Zellkerns führen zu einem besseren Verständnis der epigenetischen Regulation.

Bei Pflanzen ist im Falle einiger Hybride eine Separation parental Genome bereits seit längerem bekannt. Auch in sehr frühen Säugerembryos gibt es deutliche Hinweise auf eine Genomseparation (siehe Einleitung). Dabei handelt es sich offensichtlich um eine unmittelbare Folge der Befruchtung und der Fusion der beiden Genome. Sie muss nicht zwangsläufig eine funktionelle Rolle in den sich daraus entwickelnden adulten Zellen spielen.

In der hier durchgeführten Untersuchung zeigte sich, dass sowohl in fetalen Maultier-Fibroblasten mit ovalen, als auch in adulten Lymphozyten mit kugelförmigen Zellkernen mütterliche und väterliche Chromosomen gleichmäßig verteilt sind, obwohl diese beiden Zelltypen eine unterschiedliche radiale Verteilung ihrer Chromosomenterritorien besitzen (siehe Einleitung). Keines der beiden parental Genome zeigte eine bevorzugte räumliche Position innerhalb des Nukleus (siehe 3.4.3.1). In beiden Zelltypen kam es außerdem zu einer Zusammenlagerung von Chromozentren aus beiden Elterngenomen (siehe 3.4.3.3 und Abb. 63), was zusätzlich gegen eine Separation spricht. Die beiden Genome clusterten in Lymphozyten stärker als in Fibroblasten (siehe Abb. 63), bei denen einige Chromozentren nur eines der beiden elterlichen Signale beinhalten. Das liegt jedoch daran, dass die Chromozentren flacher Fibroblasten aus weniger Zentromeren aufgebaut sind als die der kugeligen Lymphozyten (Mayer 2005). Eine gleichmäßige Durchmischung parental DNA war auch in mitotischen Maultierzellen zu beobachten (siehe 3.4.3.2). Pro- und Metaphasen zeigten eine gleichmäßige Verteilung der beiden Chromosomensätze. Eine Genomseparation kann zumindest für diese Zelltypen ausgeschlossen werden. Keines der drei vorgeschlagenen Muster der Genomseparation (siehe Abb. 3) konnte nachgewiesen werden.

In neueren Studien wird eine räumliche Trennung parental Genome bei Säugerzellen beschrieben und es stellt sich die Frage, wie diese im Hinblick auf die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zu bewerten sind:

Publikationen von Nagele und Mitarbeitern (Nagele 1995; Nagele 1998; Nagele 1999) stellen die wahrscheinlich bekanntesten Arbeiten dar, welche eine Trennung haploider Genome vertreten. Sie beschreiben eine präzise, antiparallele Positionierung von Chromosomen in menschlichen Fibroblasten und HeLa-Zellen, sowohl in der Prophaserosette als auch in Interphasekernen. Eine solche Anordnung konnte in zahlreichen Folgestudien widerlegt werden

(Allison 1999; Cornforth 2002; Bolzer 2005). Eine auf antiparalleler Chromosomenposition basierende Genomseparation existiert folglich nicht.

Chaudhuri und Mitarbeiter schließen aus einer unterschiedlich intensiven DAPI-Färbung in einigen Nuklei verschiedener Blut- und Knochenmarkszellen auf ein „biphasisches“ Muster mit zwei getrennten haploiden Genomen (Chaudhuri 2005). Dies ist für die Autoren die naheliegendste Erklärung, auch wenn haploide Genome nicht zwangsläufig einen getrennten maternalen und paternalen Chromosomensatz darstellen müssen. Des Weiteren wirken viele Nuklei in den Abbildungen beider Veröffentlichungen stark „ausgefranst“, häufig ohne klare Trennung der beiden angeblichen Kompartimente. Bei dem beobachteten biphasischen Muster könnte es sich folglich um Fixierungsartefakte der Ethanoleisessig-Behandlung handeln, auch wenn die Autoren dies dementieren. Die Anzahl solcher Kerne ist noch dazu sehr gering, durchschnittlich nur 1,5% der untersuchten Blut- und Knochenmarkszellen von krebskranken Patienten und 0,18% der gesunden Kontrollgruppen. Drei Viertel der Proben enthalten gar keine dieser Zellen. Wiederum nur ein Bruchteil dieser Zellen zeigt die Aufteilung homologer Signale in Bereiche unterschiedlicher DAPI-Intensität. In jedem FISH-Experiment werden lediglich zwei bis maximal drei homologe Loci gleichzeitig untersucht. Die angefertigten Aufnahmen der FISH-Signale werden an einem einfachen Fluoreszenzmikroskop angefertigt, welches keine dreidimensionale Darstellung der Nuklei ermöglicht. Aus diesen Gründen sollte die von den Autoren abgeleitete Verallgemeinerung für das gesamte Genom bezüglich Separation sehr kritisch betrachtet werden.

Die bis zu diesem Zeitpunkt zuverlässigsten Daten bezüglich nicht-embryonaler Interphasekerne von Säugern scheinen die Arbeiten von W. Mayer und Mitarbeitern zu liefern (Mayer 2000a). Hier wird DNA in Hybridzellen der Maus mittels FISH direkt visualisiert. Besonders auffällig ist die komplette räumliche Trennung maternaler und paternaler Zentromere in männlichen haploiden Keimzellen (siehe Abb. 2g). In adulten Fibroblasten wird eine nicht-zufällige Anordnung der beiden elterlichen Genome in 5-10% der Fälle beschrieben (siehe Abb. 2f). Die sechs in diesem Artikel (Mayer 2000a) abgebildeten Beispiele zeigen jedoch kein gemeinsames Verteilungsmuster. In einigen können die Zentromere der beiden unterschiedlichen Elternspezies mittels einer Linie getrennt werden. Andere Nuklei besitzen Zentromere des einen Elterntiers im Zentrum und die des anderen in der Peripherie. Die Autoren gehen nicht darauf ein, mit welcher Wahrscheinlichkeit eines dieser Muster unter einer großen Anzahl von Nuklei zufällig auftritt. Sie benutzen eine Fixierungsmethode für Zellkerne, die hypotone Behandlung, Methanoleisessig, Auftropfen der Zellen und Lufttrocknen beinhaltet. Diese Prozedur ermöglicht keine dreidimensionale Konservierung und beeinflusst die Kernmorphologie massiv (Solovei 2002; Heppner 2007).

Im Fall der Maultiere wurde in der vorliegenden Arbeit auf 2D-Präparaten (nicht jedoch 3D-Präparaten) durch gezielte Suche bei lediglich ca. 1% der Fibroblasten-Interphasekerne ebenfalls ein nicht-zufällig wirkendes Verteilungsmuster gefunden (siehe Abb. 54). Betrachtet man in diesen Fällen die einzelnen Farbkanäle getrennt voneinander, so stellt man fest, dass es sich in den meisten Fällen möglicherweise nur scheinbar um ein nicht-zufälliges Verteilungsmuster der Elterngenome handelt. Häufig sind beide Signale relativ gleichmäßig verteilt, jedoch in manchen Bereichen des Kerns von unterschiedlicher Intensität, wodurch es zu einer scheinbaren Trennung in der Projektion kommt.

Es ist durchaus denkbar, dass eine bestimmte Erwartungshaltung der Studie von W. Mayer bezüglich der Genomseparation zu einer unbewussten Selektion bestimmter Kerne unter dem Mikroskop und somit zu einem erhöhten Anteil abweichender Muster bei Mausfibroblasten geführt hat. Eine grundlegend unterschiedliche Verteilung in den Fibroblasten von Maus und

Maultier als Erklärung für die Unterschiede bei den Beobachtungen ist dagegen eher unwahrscheinlich. Es würde völlig verschiedene Organisationsprinzipien in zwei Säugerzellen mit gleicher Funktion voraussetzen.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführte FISH auf 3D-fixierten Präparaten und die anschließende radiale Auswertung zeigte eine gleichmäßige Verteilung maternaler und paternaler DNA in Maultierzellen. Die dafür aufgenommenen Zellkerne wurden rein zufällig ausgewählt. Die hier erzielten Ergebnisse deuten klar auf eine Vermischung der elterlichen Genome hin.

5 Zusammenfassung

Die räumliche Organisation von Chromatin im Zellkern spielt bei der Genomregulierung und damit der Genexpression eine wichtige Rolle. Zahlreiche Aspekte dieser hochorganisierten Anordnung von DNA wurden in den letzten Jahren anhand verschiedenster Zelltypen und Experimente untersucht und einige allgemeine Regeln festgestellt. Sie leisten einen wichtigen Beitrag zum besseren Verständnis der Zellkernarchitektur. In dieser Arbeit wurden mehrere Modelle der Chromatinorganisation im Zellkern überprüft.

Das lac-Operator/lac-Repressor-GFP System dient der Markierung subchromosomaler Regionen, die in vivo über lange Zeiträume verfolgt werden können. Im Rahmen dieser Arbeit gelang keine stabile Integration dieses Systems in embryonale Stammzellen der Maus mit bereits vorhandenen Plasmiden. Es wurde ein neues Operatorplasmid mit einem Lysozym-Transgen kloniert. Die zelltypspezifische Funktion dieses Transgens in ES-Zellen und seine Aktivierbarkeit mittels Differenzierung zu Makrophagen war bereits durch eine andere Arbeitsgruppe nachgewiesen worden.

Um DNA mittels FISH (Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung) in Zellkernen nachweisen zu können, müssen die Zellen zunächst fixiert werden. Die dreidimensionale Organisation innerhalb des Kerns soll dabei so gut wie möglich erhalten bleiben. Die beiden dafür gängigsten Methoden sind Fixierung mit Paraformaldehyd (PFA), und Fixierung mit Methanoleisessig nach hypotoner Behandlung mit anschließendem Lufttrocknen der Präparate (Hypo-MAA). In dieser Arbeit wurden die Auswirkungen beider Methoden auf Mauszellkerne vor und nach FISH untersucht. Die anfärbbaren Chromozentren von Mauszellen bieten dabei eine zusätzliche Möglichkeit den Strukturerhalt des Chromatins zu beurteilen. Qualitative und quantitative Auswertung zeigte, dass die PFA-Fixierung eine gute Konservierung der „large-scale“-Chromatinstruktur ermöglicht. Im Gegensatz dazu veränderte die Hypo-MAA-Fixierung die Kernform und führte zum Zerfall der Chromosomenterritorien und Chromozentren. Auch die radiale Positionierung von Genloci in den zugehörigen Chromosomenterritorien wurde beeinflusst. Damit konnte gezeigt werden, dass diese Art der Fixierung nicht die in vivo Gegebenheiten im Nukleus widerspiegelt.

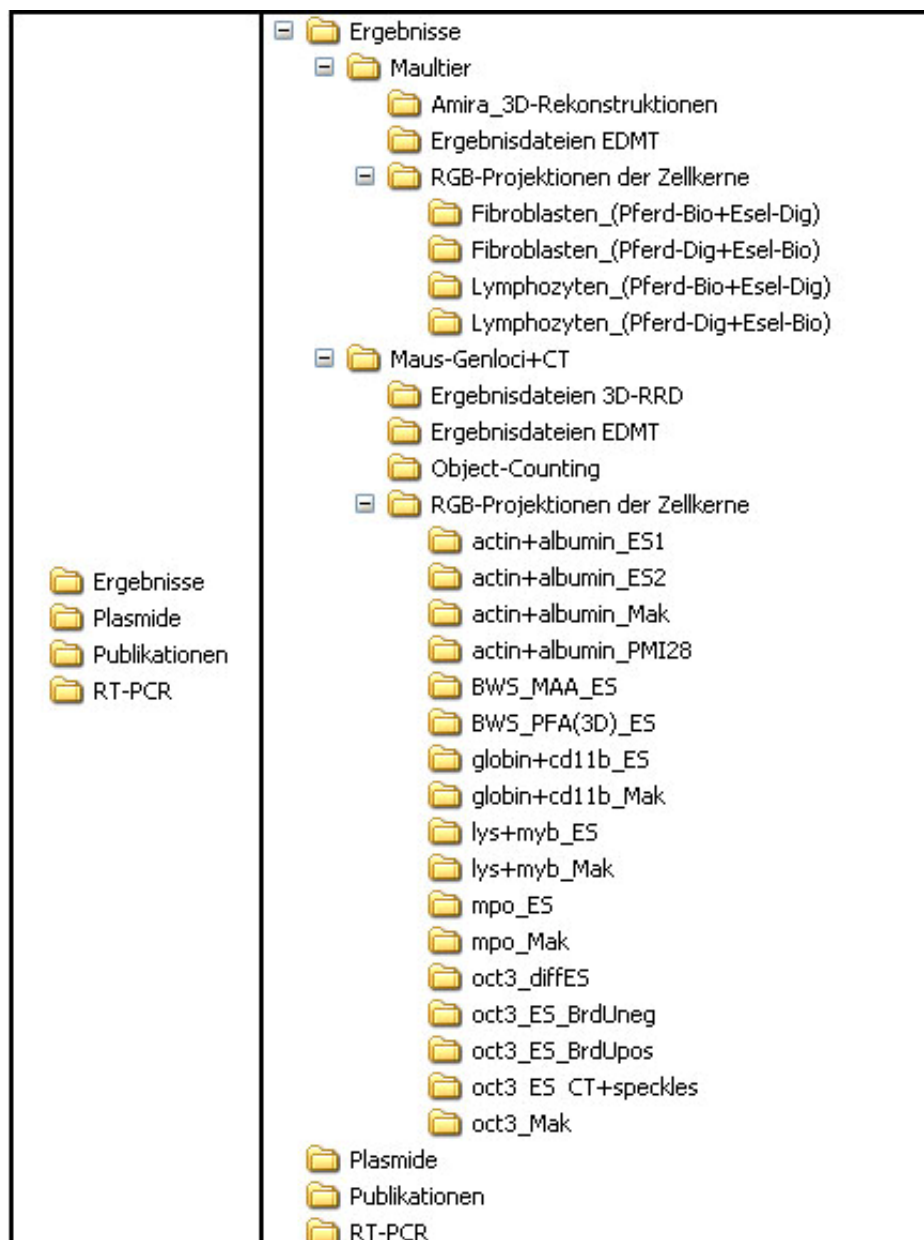
Um die dreidimensionale Organisation im Zellkern besser zu verstehen, wurde die Position von acht Genloci vier verschiedener Chromosomen untersucht. Dies geschah mittels FISH auf PFA-fixierten, zyklierenden embryonalen Mausstammzellen und in vitro differenzierten postmitotischen Makrophagen, anschließender konfokaler Mikroskopie und quantitativer 3D-Bildauswertung. Die Genloci beinhalteten Fälle mit ähnlicher Gendichte, aber unterschiedlichem GC-Gehalt, so dass Positionierungseffekte dieser beiden Eigenschaften unterschieden werden konnten. Indem einzelne Loci und nicht BAC-Pools untersucht wurden, konnte eine potentielle Abschwächung der Positionierungseffekte durch Mittelung vermieden werden. Die Ergebnisse zeigten, dass die bevorzugte Position eines bestimmten Locus zwischen den beiden Zelltypen variieren kann. Damit ist eine Genpositionierung als bloße Folge der DNA-Sequenz ausgeschlossen. In den meisten Fällen unterschied sich die durchschnittliche, radiale Position eines Locus innerhalb des Kerns signifikant von der durchschnittlichen radialen Position des zugehörigen Chromosomenterritoriums. Folglich besetzen Genloci bevorzugte Subregionen innerhalb eines Territoriums. Die ermittelten Daten zeigten keine Korrelation der radialen Position eines Locus mit der lokalen Gendichte, wie es für humane Zellen beschrieben wurde. Stattdessen korrelierte die Position mit dem GC-Gehalt und anderen repetitiven Elementen. Dies legt nahe, dass nicht die Gendichte selbst, sondern andere, häufig mit ihr assoziierte genomische Eigenschaften eine wichtige Rolle bei der Chromatinorganisation im Zellkern spielen.

Die Frage, ob vom Vater und von der Mutter geerbte Chromosomen in Interphasekernen getrennte Bereiche einnehmen, stellte man sich erstmals bereits Ende des 19. Jahrhunderts. In den letzten Jahren ist die Anordnung des Chromatins im Zellkern zunehmend als eine wichtige Stufe der epigenetischen Regulation in den Blickpunkt gerückt. In diesem Zusammenhang ist es wichtig zu wissen, ob elterliche Genome getrennt vorliegen oder nicht. Für einige Pflanzenhybride und frühe embryonale Säugerzellen ist eine Genomseparation bereits belegt. Für adulte Säugerzellen existierten bisher widersprüchliche Daten. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit die Verteilung von Pferde- und Eselchromosomen in den Zellkernen von Fibroblasten und Lymphozyten des Maultiers mit Hilfe von Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) untersucht. Dies ist möglich, da sich Pferd (*E. caballus*) und Esel (*E. asinus*) seit ca. zwei Millionen Jahren getrennt voneinander entwickeln. Besonders die Zentromersequenzen unterscheiden sich ausreichend, um sie in den hybriden Zellen des Maultiers (*E. caballus* × *E. asinus*) getrennt voneinander nachweisen zu können. Weder in kugelförmigen, postmitotischen Lymphozyten noch in elipsoiden, zyklierenden Fibroblasten konnte mittels quantitativer und qualitativer Auswertung der Signalverteilung eine Separation der parentalen Genome nachgewiesen werden. Die Signale der Eltern verteilen sich gleichmäßig innerhalb der Nuklei und in den untersuchten Prometaphasen. Zudem bilden sie in Interphasekernen gemeinsame Chromozentren, was ebenfalls gegen eine Trennung spricht.

6 Anhang

Der Inhalt der beiliegenden CD:

- Die Dissertation als pdf-Datei
- 3D-RRD und EDMT Ergebnisdateien
- Karten der verwendeten Plasmide
- Eigene Publikationen
- Primer- und cDNA-Sequenzen der RT-PCRs



7 Literatur

- Alberts, B., D. Bray, et al. (2005). "Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie." WILEY-VCH Verlag GmbH, Weinheim.
- Albiez, H., M. Cremer, et al. (2006). "Chromatin domains and the interchromatin compartment form structurally defined and functionally interacting nuclear networks." Chromosome Res **14**(7): 707-33.
- Allison, D. C. and A. L. Nestor (1999). "Evidence for a relatively random array of human chromosomes on the mitotic ring." J Cell Biol **145**(1): 1-14.
- Arnoldus, E., A. Peters, et al. (1989). "Somatic pairing of chromosome 1 centromeres in interphase nuclei of human cerebellum." Hum-Genet(83): 231-234.
- Bacher, C. P., M. Guggiari, et al. (2006). "Transient colocalization of X-inactivation centres accompanies the initiation of X inactivation." Nat Cell Biol **8**(3): 293-9.
- Bartlett, J., J. Blagojevic, et al. (2006). "Specialized transcription factories." Biochem Soc Symp(73): 67-75.
- Bartova, E., S. Kozubek, et al. (2001). "Higher-order chromatin structure of human granulocytes." Chromosoma **110**(5): 360-70.
- Bartova, E., S. Kozubek, et al. (2002). "Nuclear structure and gene activity in human differentiated cells." J Struct Biol **139**(2): 76-89.
- Bartova, E. and S. Kozubek (2006). "Nuclear architecture in the light of gene expression and cell differentiation studies." Biol Cell **98**(6): 323-36.
- Bartova, E., J. Krejci, et al. (2008). "Differentiation of human embryonic stem cells induces condensation of chromosome territories and formation of heterochromatin protein 1 foci." Differentiation **76**(1): 24-32.
- Belmont, A. S., M. B. Braunfeld, et al. (1989). "Large-scale chromatin structural domains within mitotic and interphase chromosomes in vivo and in vitro." Chromosoma **98**(2): 129-43.
- Belmont, A. S. and A. F. Straight (1998). "In vivo visualization of chromosomes using lac operator-repressor binding." Trends Cell Biol **8**(3): 121-4.
- Belmont, A. S., S. Dietzel, et al. (1999). "Large-scale chromatin structure and function." Curr Opin Cell Biol **11**(3): 307-11.
- Belmont, A. S. (2001). "Visualizing chromosome dynamics with GFP." Trends Cell Biol **11**(6): 250-7.
- Bennett, S. T. and M. D. Bennett (1992). "Spatial Separation of Ancestral Genomes in the Wild Grass *Milium-Montanum* Parl." Annals of Botany **70**: 111-118.
- Berezney, R., D. D. Dubey, et al. (2000). "Heterogeneity of eukaryotic replicons, replicon clusters, and replication foci." Chromosoma **108**(8): 471-84.
- Bernardi, G. (2000). "Isochores and the evolutionary genomics of vertebrates." Gene **241**(1): 3-17.

- Bolzer, A., G. Kreth, et al. (2005). "Three-dimensional maps of all chromosomes in human male fibroblast nuclei and prometaphase rosettes." *PLoS Biol* **3**(5): e157.
- Bonifer, C., U. Jagle, et al. (1997). "The chicken lysozyme locus as a paradigm for the complex developmental regulation of eukaryotic gene loci." *J Biol Chem* **272**(42): 26075-8.
- Boveri, T. (1888). "Zellen-Studien II. Die Befruchtung und Teilung des Eies von Ascaris Megalocephala." *Jenaische Zeitschrift für Naturwissenschaft*(22): 685-882.
- Boyle, S., S. Gilchrist, et al. (2001). "The spatial organization of human chromosomes within the nuclei of normal and emerin-mutant cells." *Hum Mol Genet* **10**(3): 211-9.
- Brandriff, B. F., L. A. Gordon, et al. (1991). "The male-derived genome after sperm-egg fusion: spatial distribution of chromosomal DNA and paternal-maternal genomic association." *Chromosoma* **100**(4): 262-6.
- Bridge, J. A., M. Nelson, et al. (1997). "Cytogenetic findings in 73 osteosarcoma specimens and a review of the literature." *Cancer Genet Cytogenet* **95**(1): 74-87.
- Bridger, J. M., S. Boyle, et al. (2000). "Re-modelling of nuclear architecture in quiescent and senescent human fibroblasts." *Curr Biol* **10**(3): 149-52.
- Brown, J. M., J. Leach, et al. (2006). "Coregulated human globin genes are frequently in spatial proximity when active." *J Cell Biol* **172**(2): 177-87.
- Brown, K. E., S. S. Guest, et al. (1997). "Association of transcriptionally silent genes with Ikaros complexes at centromeric heterochromatin." *Cell* **91**(6): 845-54.
- Brown, K. E., S. Amols, et al. (2001). "Expression of alpha- and beta-globin genes occurs within different nuclear domains in haemopoietic cells." *Nat Cell Biol* **3**(6): 602-6.
- Bulger, M., J. H. van Doorninck, et al. (1999). "Conservation of sequence and structure flanking the mouse and human beta-globin loci: the beta-globin genes are embedded within an array of odorant receptor genes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(9): 5129-34.
- Capy, P., T. Langin, et al. (1997). "Do the integrases of LTR-retrotransposons and class II element transposases have a common ancestor?" *Genetica* **100**(1-3): 63-72.
- Carmo-Fonseca, M. (2002). "New clues to the function of the Cajal body." *EMBO Rep* **3**(8): 726-7.
- Chalfie, M. (1995). "Green fluorescent protein." *Photochem Photobiol* **62**(4): 651-6.
- Chambeyron, S. and W. A. Bickmore (2004). "Chromatin decondensation and nuclear reorganization of the HoxB locus upon induction of transcription." *Genes Dev* **18**(10): 1119-30.
- Chambeyron, S., N. R. Da Silva, et al. (2005). "Nuclear re-organisation of the Hoxb complex during mouse embryonic development." *Development* **132**(9): 2215-23.
- Chaudhuri, J. P. and J. U. Walther (2003). "Separation of parental genomes in human blood and bone marrow cells and its implications." *Int J Oncol* **23**(5): 1257-62.
- Chaudhuri, J. P., E. Kasprzycki, et al. (2005). "Biphasic chromatin structure and FISH signals in reflect intranuclear order." *Cell Oncol* **27**(5-6): 327-34.
- Cheng, J., P. Kapranov, et al. (2005). "Transcriptional maps of 10 human chromosomes at 5-nucleotide resolution." *Science* **308**(5725): 1149-54.

- Chiocchetti, A., E. Tolosano, et al. (1997). "Green fluorescent protein as a reporter of gene expression in transgenic mice." Biochim Biophys Acta **1352**(2): 193-202.
- Chong, S., A. D. Riggs, et al. (2002). "The chicken lysozyme chromatin domain contains a second, widely expressed gene." Nucleic Acids Res **30**(2): 463-7.
- Chuang, C. H., A. E. Carpenter, et al. (2006). "Long-range directional movement of an inter-phase chromosome site." Curr Biol **16**(8): 825-31.
- Collis, P., M. Antoniou, et al. (1990). "Definition of the minimal requirements within the human beta-globin gene and the dominant control region for high level expression." Embo J **9**(1): 233-40.
- Conklin, E. G. (1901). "The individuality of the germ nuclei during the cleavage of the egg of *Crepidula*." Biol. Bull. **2**.
- Conner, D. A. (2001). "Mouse embryo fibroblast (MEF) feeder cell preparation." Curr Protoc Mol Biol **Chapter 23**: Unit 23 2.
- Corbi, A. L., T. K. Kishimoto, et al. (1988). "The human leukocyte adhesion glycoprotein Mac-1 (complement receptor type 3, CD11b) alpha subunit. Cloning, primary structure, and relation to the integrins, von Willebrand factor and factor B." J Biol Chem **263**(25): 12403-11.
- Cornforth, M. N., K. M. Greulich-Bode, et al. (2002). "Chromosomes are predominantly located randomly with respect to each other in interphase human cells." J Cell Biol **159**(2): 237-44.
- Craig, J. M. and W. A. Bickmore (1993). "Chromosome bands--flavours to savour." Bioessays **15**(5): 349-54.
- Craig, J. M. (2005). "Heterochromatin--many flavours, common themes." Bioessays **27**(1): 17-28.
- Cremer, M., J. von Hase, et al. (2001a). "Non-random radial higher-order chromatin arrangements in nuclei of diploid human cells." Chromosome Res **9**(7): 541-67.
- Cremer, T., A. Kurz, et al. (1993). "Role of chromosome territories in the functional compartmentalization of the cell nucleus." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **58**: 777-92.
- Cremer, T. and C. Cremer (2001b). "Chromosome territories, nuclear architecture and gene regulation in mammalian cells." Nat Rev Genet **2**(4): 292-301.
- Cremer, T., K. Kupper, et al. (2004). "Higher order chromatin architecture in the cell nucleus: on the way from structure to function." Biol Cell **96**(8): 555-67.
- Cremer, T. and C. Cremer (2006a). "Rise, fall and resurrection of chromosome territories: a historical perspective. Part II. Fall and resurrection of chromosome territories during the 1950s to 1980s. Part III. Chromosome territories and the functional nuclear architecture: experiments and models from the 1990s to the present." Eur J Histochem **50**(4): 223-72.
- Cremer, T., M. Cremer, et al. (2006b). "Chromosome territories--a functional nuclear landscape." Curr Opin Cell Biol **18**(3): 307-16.
- Croft, J. A., J. M. Bridger, et al. (1999). "Differences in the localization and morphology of chromosomes in the human nucleus." J Cell Biol **145**(6): 1119-31.

- Cross, M. and R. Renkawitz (1990). "Repetitive sequence involvement in the duplication and divergence of mouse lysozyme genes." Embo J **9**(4): 1283-8.
- Dehghani, H., G. Dellaire, et al. (2005). "Organization of chromatin in the interphase mammalian cell." Micron **36**(2): 95-108.
- Deininger, P. L. and M. A. Batzer (2002). "Mammalian retroelements." Genome Res **12**(10): 1455-65.
- Deng, W., S. W. Tsao, et al. (2003). "A new method for improving metaphase chromosome spreading." Cytometry A **51**(1): 46-51.
- Dewannieux, M. and T. Heidmann (2005). "LINEs, SINEs and processed pseudogenes: parasitic strategies for genome modeling." Cytogenet Genome Res **110**(1-4): 35-48.
- Dietzel, S., A. Jauch, et al. (1998). "Separate and variably shaped chromosome arm domains are disclosed by chromosome arm painting in human cell nuclei." Chromosome Res **6**(1): 25-33.
- Dietzel, S., K. Schiebel, et al. (1999). "The 3D positioning of ANT2 and ANT3 genes within female X chromosome territories correlates with gene activity." Exp Cell Res **252**(2): 363-75.
- Dietzel, S. and A. S. Belmont (2001). "Reproducible but dynamic positioning of DNA in chromosomes during mitosis." Nat Cell Biol **3**(8): 767-70.
- Dietzel, S., K. Zolghadr, et al. (2004). "Differential large-scale chromatin compaction and intranuclear positioning of transcribed versus non-transcribed transgene arrays containing beta-globin regulatory sequences." J Cell Sci **117**(Pt 19): 4603-14.
- Dundr, M. and T. Misteli (2001). "Functional architecture in the cell nucleus." Biochem J **356**(Pt 2): 297-310.
- Egger, G., G. Liang, et al. (2004). "Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy." Nature **429**(6990): 457-63.
- Eickbush, T. H. and V. K. Jamburuthugoda (2008). "The diversity of retrotransposons and the properties of their reverse transcriptases." Virus Res.
- Fakan, S. and R. van Driel (2007). "The perichromatin region: a functional compartment in the nucleus that determines large-scale chromatin folding." Semin Cell Dev Biol **18**(5): 676-81.
- Faust, N., C. Bonifer, et al. (1994). "An in vitro differentiation system for the examination of transgene activation in mouse macrophages." DNA Cell Biol **13**(9): 901-7.
- Faust, N. (1997). "Transgene Analysis in Mouse Embryonic Stem Cells Differentiation In Vitro." CRC Press.
- Federico, C., S. Saccone, et al. (2004). "The pig genome: compositional analysis and identification of the gene-rich regions in chromosomes and nuclei." Gene **343**(2): 245-51.
- Federico, C., C. D. Cantarella, et al. (2005). "Avian genomes: different karyotypes but a similar distribution of the GC-rich regions in chromosomes and nuclei." Chromosome Res **13**(8): 785-93.

- Federico, C., C. Scavo, et al. (2006). "Gene-rich and gene-poor chromosomal regions have different locations in the interphase nuclei of cold-blooded vertebrates." Chromosoma **115**(2): 123-8.
- Ferreira, J., G. Paoletta, et al. (1997). "Spatial organization of large-scale chromatin domains in the nucleus: a magnified view of single chromosome territories." J Cell Biol **139**(7): 1597-610.
- Foster, H. A. and J. M. Bridger (2005). "The genome and the nucleus: a marriage made by evolution. Genome organisation and nuclear architecture." Chromosoma **114**(4): 212-29.
- Fraga, M. F., E. Ballestar, et al. (2005). "Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(30): 10604-9.
- Francastel, C., W. Magis, et al. (2001). "Nuclear relocation of a transactivator subunit precedes target gene activation." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(21): 12120-5.
- Fraschini, A., C. Pellicciari, et al. (1981). "The effect of different fixatives on chromatin: cytochemical and ultrastructural approaches." Histochem J **13**(5): 763-9.
- Fraser, P. and W. Bickmore (2007). "Nuclear organization of the genome and the potential for gene regulation." Nature **447**(7143): 413-7.
- Fuks, F. (2005). "DNA methylation and histone modifications: teaming up to silence genes." Curr Opin Genet Dev **15**(5): 490-5.
- Fung, J. C., W. F. Marshall, et al. (1998). "Homologous chromosome pairing in *Drosophila melanogaster* proceeds through multiple independent initiations." J Cell Biol **141**(1): 5-20.
- Gadi, I. K. and O. A. Ryder (1983). "Molecular cytogenetics of the equidae. II. purification and cytological localization of a (G + C)-rich satellite DNA from *Equus hemionus onager* and cross-species hybridization to *E. asinus* chromosomes." Cytogenet Cell Genet **35**(2): 124-30.
- Gläss, E. (1956). "Die Identifizierung der Chromosomen im Karyotyp der Rattenleber." Chromosoma(7): 655-699.
- Gläss, E. (1957). "Das Problem der Genomsonderung in den Mitosen unbehandelter Rattenlebern." Chromosoma(8): 468-492.
- Guerrini, F., S. Bucci, et al. (1997). "Genomes of two water frog species resist germ line exclusion in interspecies hybrids." J Exp Zool **279**(2): 163-76.
- Habermann, F. A., M. Cremer, et al. (2001). "Arrangements of macro- and microchromosomes in chicken cells." Chromosome Res **9**(7): 569-84.
- Häcker, V. (1895). "Über die Selbstständigkeit der väterlichen und mütterlichen Kernbestandteile." Archiv f. mikrosk. Anat. XLVI.
- Hendzel, M. J. and D. P. Bazett-Jones (1997). "Fixation-dependent organization of core histones following DNA fluorescent in situ hybridization." Chromosoma **106**(2): 114-23.
- Heppenger, C. (2002). "Untersuchung der Interphase - Chromatinorganisation mittels lac Operator / lac Repressor - GFP Markierung."

- Hepperger, C., S. Otten, et al. (2007). "Preservation of large-scale chromatin structure in FISH experiments." Chromosoma **116**(2): 117-33.
- Hepperger, C., A. Mannes, et al. (2008). "Three-dimensional positioning of genes in mouse cell nuclei." Chromosoma im Druck.
- Hertwig, O. (1906). "Allgemeine Biologie." Verlag von Gustav Fisher, Jena.
- Heun, P., T. Laroche, et al. (2001). "Chromosome dynamics in the yeast interphase nucleus." Science **294**(5549): 2181-6.
- Higgs, D. R. (1998). "Do LCRs open chromatin domains?" Cell **95**(3): 299-302.
- Hsu, T. C., J. E. Cooper, et al. (1971). "Arrangement of centromeres in mouse cells." Chromosoma **34**(1): 73-87.
- Huang, S. and D. L. Spector (1996). "Intron-dependent recruitment of pre-mRNA splicing factors to sites of transcription." J Cell Biol **133**(4): 719-32.
- Irintchev, A., M. Langer, et al. (1997). "Functional improvement of damaged adult mouse muscle by implantation of primary myoblasts." J Physiol **500 (Pt 3)**: 775-85.
- Jabbari, K. and G. Bernardi (2004). "Body temperature and evolutionary genomics of vertebrates: a lesson from the genomes of Takifugu rubripes and Tetraodon nigroviridis." Gene **333**: 179-81.
- Jackson, D. A. and A. Pombo (1998). "Replicon clusters are stable units of chromosome structure: evidence that nuclear organization contributes to the efficient activation and propagation of S phase in human cells." J Cell Biol **140**(6): 1285-95.
- Jenuwein, T. and C. D. Allis (2001). "Translating the histone code." Science **293**(5532): 1074-80.
- Kanda, T., K. F. Sullivan, et al. (1998). "Histone-GFP fusion protein enables sensitive analysis of chromosome dynamics in living mammalian cells." Curr Biol **8**(7): 377-85.
- Katoh, K., Y. Takahashi, et al. (1987). "Improved mammalian vectors for high expression of G418 resistance." Cell Struct Funct **12**(6): 575-80.
- Kaufmann, U., J. Kirsch, et al. (1999). "The M-cadherin catenin complex interacts with microtubules in skeletal muscle cells: implications for the fusion of myoblasts." J Cell Sci **112 (Pt 1)**: 55-68.
- Kernohan, N. M., H. F. Sewell, et al. (1990). "Natural killer cells in cutaneous malignant melanoma." J Pathol **161**(1): 35-40.
- Knippers (2001). Molekulare Genetik. Stuttgart, Georg Thieme Verlag.
- Koberna, K., A. Ligasova, et al. (2005). "Electron microscopy of DNA replication in 3-D: evidence for similar-sized replication foci throughout S-phase." J Cell Biochem **94**(1): 126-38.
- Kobliakova, I., O. Zatsepina, et al. (2005). "The topology of early- and late-replicating chromatin in differentially decondensed chromosomes." Chromosome Res **13**(2): 169-81.

- Koestenbauer, S., N. H. Zech, et al. (2006). "Embryonic stem cells: similarities and differences between human and murine embryonic stem cells." Am J Reprod Immunol **55**(3): 169-80.
- Korenberg, J. R. and M. C. Rykowski (1988). "Human genome organization: Alu, lines, and the molecular structure of metaphase chromosome bands." Cell **53**(3): 391-400.
- Kosak, S. T., J. A. Skok, et al. (2002). "Subnuclear compartmentalization of immunoglobulin loci during lymphocyte development." Science **296**(5565): 158-62.
- Kosak, S. T. and M. Groudine (2004). "Form follows function: The genomic organization of cellular differentiation." Genes Dev **18**(12): 1371-84.
- Kouzarides, T. (2007). "Chromatin modifications and their function." Cell **128**(4): 693-705.
- Kozubek, S., E. Lukasova, et al. (2000). "Influence of cell fixation on chromatin topography." Anal Biochem **282**(1): 29-38.
- Kumaran, R. I. and D. L. Spector (2008). "A genetic locus targeted to the nuclear periphery in living cells maintains its transcriptional competence." J Cell Biol **180**(1): 51-65.
- Küpper, K., A. Kolbl, et al. (2007). "Radial chromatin positioning is shaped by local gene density, not by gene expression." Chromosoma **116**(3): 285-306.
- Kurz, A., S. Lampel, et al. (1996). "Active and inactive genes localize preferentially in the periphery of chromosome territories." J Cell Biol **135**(5): 1195-205.
- Lamond, A. I. and D. L. Spector (2003). "Nuclear speckles: a model for nuclear organelles." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(8): 605-12.
- Lancôt, C., T. Cheutin, et al. (2007a). "Dynamic genome architecture in the nuclear space: regulation of gene expression in three dimensions." Nat Rev Genet **8**(2): 104-15.
- Lancôt, C., C. Kaspar, et al. (2007b). "Positioning of the mouse Hox gene clusters in the nuclei of developing embryos and differentiating embryoid bodies." Exp Cell Res **313**(7): 1449-59.
- Lander, E. S., L. M. Linton, et al. (2001). "Initial sequencing and analysis of the human genome." Nature **409**(6822): 860-921.
- Larsen, F., G. Gundersen, et al. (1992). "CpG islands as gene markers in the human genome." Genomics **13**(4): 1095-107.
- Lasken, R. S. and M. Egholm (2003). "Whole genome amplification: abundant supplies of DNA from precious samples or clinical specimens." Trends Biotechnol **21**(12): 531-5.
- Lawrence, J. B. and R. H. Singer (1985). "Quantitative analysis of in situ hybridization methods for the detection of actin gene expression." Nucleic Acids Res **13**(5): 1777-99.
- Leitch, A. R., T. Schwarzacher, et al. (1991). "Parental genomes are separated throughout the cell cycle in a plant hybrid." Chromosoma **101**: 206-213.
- Lengauer, C., H. C. Riethman, et al. (1992). "Metaphase and interphase cytogenetics with Alu-PCR-amplified yeast artificial chromosome clones containing the BCR gene and the protooncogenes c-raf-1, c-fms, and c-erbB-2." Cancer Res **52**(9): 2590-6.

- Levsky, J. M. and R. H. Singer (2003). "Fluorescence in situ hybridization: past, present and future." J Cell Sci **116**(Pt 14): 2833-8.
- Lima-Brito, J., H. Guedes-Pinto, et al. (1996). "Chromosome identification and nuclear architecture in triticales x tritordeum F-1 hybrids." Journal of Experimental Botany **47**: 583-588.
- Lomvardas, S., G. Barnea, et al. (2006). "Interchromosomal interactions and olfactory receptor choice." Cell **126**(2): 403-13.
- Longo, F., S. Garagna, et al. (2003). "Nuclear localization of NORs and centromeres in mouse oocytes during folliculogenesis." Mol Reprod Dev **66**(3): 279-90.
- Lukasova, E., S. Kozubek, et al. (2002). "The 3D structure of human chromosomes in cell nuclei." Chromosome Res **10**(7): 535-48.
- Mahy, N. L., P. E. Perry, et al. (2002a). "Gene density and transcription influence the localization of chromatin outside of chromosome territories detectable by FISH." J Cell Biol **159**(5): 753-63.
- Mahy, N. L., P. E. Perry, et al. (2002b). "Spatial organization of active and inactive genes and noncoding DNA within chromosome territories." J Cell Biol **157**(4): 579-89.
- Malhas, A., C. F. Lee, et al. (2007). "Defects in lamin B1 expression or processing affect interphase chromosome position and gene expression." J Cell Biol **176**(5): 593-603.
- Mannes, A. (2006). "Untersuchung zur Verteilung von aktiven und inaktiven Genregionen in verschiedenen Zelltypen in Bezug auf den Zellkern und ihre Chromosomenterritorien." Diplomarbeit, München (LMU), Department für Biologie II.
- Martens, J. H., R. J. O'Sullivan, et al. (2005). The profile of repeat-associated histone lysine methylation states in the mouse epigenome. Embo J. **24**: 800-12.
- Mayer, R., A. Brero, et al. (2005). "Common themes and cell type specific variations of higher order chromatin arrangements in the mouse." BMC Cell Biol **6**: 44.
- Mayer, R. (2006). "Anordnung und Struktur von Chromosomenterritorien in Mauszellen: Zelltypspezifische Unterschiede und Gemeinsamkeiten." Dissertation.
- Mayer, W., A. Smith, et al. (2000a). "Spatial separation of parental genomes in preimplantation mouse embryos." J Cell Biol **148**(4): 629-34.
- Mayer, W., R. Fundele, et al. (2000b). "Spatial separation of parental genomes during mouse interspecific (Mus musculus x M. spretus) spermiogenesis." Chromosome Res **8**(6): 555-8.
- Mazia, D., G. Schatten, et al. (1975). "Adhesion of cells to surfaces coated with polylysine. Applications to electron microscopy." J Cell Biol **66**(1): 198-200.
- Meaburn, K. J., E. Cabuy, et al. (2007a). "Primary laminopathy fibroblasts display altered genome organization and apoptosis." Aging Cell **6**(2): 139-53.
- Meaburn, K. J. and T. Misteli (2007b). "Cell biology: chromosome territories." Nature **445**(7126): 379-781.

- Meaburn, K. J. and T. Misteli (2008). "Locus-specific and activity-independent gene repositioning during early tumorigenesis." J Cell Biol **180**(1): 39-50.
- Merkenschlager, M., S. Amoils, et al. (2004). "Centromeric repositioning of coreceptor loci predicts their stable silencing and the CD4/CD8 lineage choice." J Exp Med **200**(11): 1437-44.
- Misteli, T. (2000). "Cell biology of transcription and pre-mRNA splicing: nuclear architecture meets nuclear function." J Cell Sci **113** (Pt 11): 1841-9.
- Misteli, T. (2005). "Concepts in nuclear architecture." Bioessays **27**(5): 477-87.
- Misteli, T. (2007). "Beyond the sequence: cellular organization of genome function." Cell **128**(4): 787-800.
- Moenkhaus, W. J. (1904). "The development of the hybrids between *Fundulus heteroclitus* and *Mendia notata* with especial reference to the behaviour of the maternal and paternal chromatin." American Journal of Anatomy. III.
- Murmann, A. E., J. Gao, et al. (2005). "Local gene density predicts the spatial position of genetic loci in the interphase nucleus." Exp Cell Res **311**(1): 14-26.
- Nagai, T., K. Ibata, et al. (2002). "A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications." Nat Biotechnol **20**(1): 87-90.
- Nagele, R. G., T. Freeman, et al. (1995). "Precise spatial positioning of chromosomes during prometaphase: evidence for chromosomal order." Science **270**(5243): 1831-5.
- Nagele, R. G., T. Freeman, et al. (1998). "Chromosome spatial order in human cells: evidence for early origin and faithful propagation." Chromosoma **107**(5): 330-8.
- Nagele, R. G., T. Freeman, et al. (1999). "Chromosomes exhibit preferential positioning in nuclei of quiescent human cells." J Cell Sci **112** (Pt 4): 525-35.
- Nakano, T., H. Kodama, et al. (1994). "Generation of lymphohematopoietic cells from embryonic stem cells in culture." Science **265**(5175): 1098-101.
- Neusser, M., V. Schubel, et al. (2007). "Evolutionarily conserved, cell type and species-specific higher order chromatin arrangements in interphase nuclei of primates." Chromosoma **116**(3): 307-20.
- Nielsen, J. A., L. D. Hudson, et al. (2002). "Nuclear organization in differentiating oligodendrocytes." J Cell Sci **115**(Pt 21): 4071-9.
- Nikiforova, M. N., J. R. Stringer, et al. (2000). "Proximity of chromosomal loci that participate in radiation-induced rearrangements in human cells." Science **290**(5489): 138-41.
- Nishimoto, M., A. Fukushima, et al. (1999). "The gene for the embryonic stem cell coactivator UTF1 carries a regulatory element which selectively interacts with a complex composed of Oct-3/4 and Sox-2." Mol Cell Biol **19**(8): 5453-65.
- Niwa, H., J. Miyazaki, et al. (2000). "Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells." Nat Genet **24**(4): 372-6.

- O'Keefe, R. T., S. C. Henderson, et al. (1992). "Dynamic organization of DNA replication in mammalian cell nuclei: spatially and temporally defined replication of chromosome-specific alpha-satellite DNA sequences." *J Cell Biol* **116**(5): 1095-110.
- Odartchenko, N. and T. Keneklis (1973). "Localization of paternal DNA in interphase nuclei of mouse eggs during early cleavage." *Nature* **241**(5391): 528-9.
- Osborne, C. S., L. Chakalova, et al. (2004). "Active genes dynamically colocalize to shared sites of ongoing transcription." *Nat Genet* **36**(10): 1065-71.
- Otten, S. (2004). "Einfluss verschiedener Fixierungsmethoden auf die Morphologie der Zellkerne und die Chromatinstruktur bei Anwendung der Fluoreszenz in situ Hybridisierung." *Diplomarbeit, München (LMU), Department für Biologie II.*
- Parada, L. A., P. G. McQueen, et al. (2004). "Tissue-specific spatial organization of genomes." *Genome Biol* **5**(7): R44.
- Pera, F. and B. Rainer (1973). "Studies of multipolar mitoses in euploid tissue cultures. I. Somatic reduction to exactly haploid and triploid chromosome sets." *Chromosoma* **42**(1): 71-86.
- Pombo, A., P. Cuello, et al. (1998). "Regional and temporal specialization in the nucleus: a transcriptionally-active nuclear domain rich in PTF, Oct1 and PIKA antigens associates with specific chromosomes early in the cell cycle." *Embo J* **17**(6): 1768-78.
- Prasher, D. C. (1995). "Using GFP to see the light." *Trends Genet* **11**(8): 320-3.
- Quattro, J. M., J. C. Avise, et al. (1991). "Molecular evidence for multiple origins of hybridogenetic fish clones (Poeciliidae:Poeciliopsis)." *Genetics* **127**(2): 391-8.
- Raap, A. K., J. G. Marijnen, et al. (1986). "Denaturation, renaturation, and loss of DNA during in situ hybridization procedures." *Cytometry* **7**(3): 235-42.
- Rabbitts, P., H. Impey, et al. (1995). "Chromosome specific paints from a high resolution flow karyotype of the mouse." *Nat Genet* **9**(4): 369-75.
- Ragoczy, T., A. Telling, et al. (2003). "A genetic analysis of chromosome territory looping: diverse roles for distal regulatory elements." *Chromosome Res* **11**(5): 513-25.
- Ragoczy, T., M. A. Bender, et al. (2006). "The locus control region is required for association of the murine beta-globin locus with engaged transcription factories during erythroid maturation." *Genes Dev* **20**(11): 1447-57.
- Robertson, E. (1987). "Embryo-derived stem cell lines; Teratocarcinomas and Ebryonic Stem Cells - a Practical Approach." *IRL Press: Oxford; Washington DC*: 71-112.
- Robertson, G., D. Garrick, et al. (1996). "Age-dependent silencing of globin transgenes in the mouse." *Nucleic Acids Res* **24**(8): 1465-71.
- Robinett, C. C., A. Straight, et al. (1996). "In vivo localization of DNA sequences and visualization of large-scale chromatin organization using lac operator/repressor recognition." *J Cell Biol* **135**(6 Pt 2): 1685-700.
- Roix, J. J., P. G. McQueen, et al. (2003). "Spatial proximity of translocation-prone gene loci in human lymphomas." *Nat Genet* **34**(3): 287-91.

- Rosner, M. H., M. A. Vigano, et al. (1990). "A POU-domain transcription factor in early stem cells and germ cells of the mammalian embryo." Nature **345**(6277): 686-92.
- Ruby, J. G., C. Jan, et al. (2006). "Large-scale sequencing reveals 21U-RNAs and additional microRNAs and endogenous siRNAs in *C. elegans*." Cell **127**(6): 1193-207.
- Rückert, J. (1895). "Über das Selbstständigbleiben väterlicher und mütterlicher Kernsubstanz etc." Archiv f. mikrosk. Anat. **XLVI**.
- Ryder, O. A. and S. K. Hansen (1979). "Molecular cytogenetics of the Equidae. I. Purification and cytological localization of a (G + C)-rich satellite DNA from *Equus przewalskii*." Chromosoma **72**(2): 115-29.
- Saccone, S. and G. Bernardi (2001). "Human chromosomal banding by in situ hybridization of isochores." Methods Cell Sci **23**(1-3): 7-15.
- Saccone, S., C. Federico, et al. (2002). "Localization of the gene-richest and the gene-poorest isochores in the interphase nuclei of mammals and birds." Gene **300**(1-2): 169-78.
- Sadoni, N., S. Langer, et al. (1999). "Nuclear organization of mammalian genomes. Polar chromosome territories build up functionally distinct higher order compartments." J Cell Biol **146**(6): 1211-26.
- Santangelo, A. M., F. S. de Souza, et al. (2007). "Ancient exaptation of a CORE-SINE retroposon into a highly conserved mammalian neuronal enhancer of the proopiomelanocortin gene." PLoS Genet **3**(10): 1813-26.
- Saurin, A. J., C. Shiels, et al. (1998). "The human polycomb group complex associates with pericentromeric heterochromatin to form a novel nuclear domain." J Cell Biol **142**(4): 887-98.
- Scheer, U. and R. Hock (1999). "Structure and function of the nucleolus." Curr Opin Cell Biol **11**(3): 385-90.
- Scheuermann, M. O., J. Tajbakhsh, et al. (2004). "Topology of genes and nontranscribed sequences in human interphase nuclei." Exp Cell Res **301**(2): 266-79.
- Scholer, H. R., G. R. Dressler, et al. (1990). "Oct-4: a germline-specific transcription factor mapping to the mouse t-complex." Embo J **9**(7): 2185-95.
- Schroeder, T., S. T. Fraser, et al. (2003). "Recombination signal sequence-binding protein Jkappa alters mesodermal cell fate decisions by suppressing cardiomyogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(7): 4018-23.
- Schubeler, D., C. Francastel, et al. (2000). "Nuclear localization and histone acetylation: a pathway for chromatin opening and transcriptional activation of the human beta-globin locus." Genes Dev **14**(8): 940-50.
- Selig, S., K. Okumura, et al. (1992). "Delineation of DNA replication time zones by fluorescence in situ hybridization." Embo J **11**(3): 1217-25.
- Shelby, R. D., K. M. Hahn, et al. (1996). "Dynamic elastic behavior of alpha-satellite DNA domains visualized in situ in living human cells." J Cell Biol **135**(3): 545-57.

- Shopland, L. S., C. V. Johnson, et al. (2003). "Clustering of multiple specific genes and gene-rich R-bands around SC-35 domains: evidence for local euchromatic neighborhoods." J Cell Biol **162**(6): 981-90.
- Simonis, M., P. Klous, et al. (2006). "Nuclear organization of active and inactive chromatin domains uncovered by chromosome conformation capture-on-chip (4C)." Nat Genet **38**(11): 1348-54.
- Solovei, I., A. Cavallo, et al. (2002). "Spatial preservation of nuclear chromatin architecture during three-dimensional fluorescence in situ hybridization (3D-FISH)." Exp Cell Res **276**(1): 10-23.
- Solovei, I., N. Grandi, et al. (2004). "Postnatal changes of pericentromeric heterochromatin and nucleoli in postmitotic Purkinje cells during murine cerebellum development." Cytogenetics and Genome Research (105): 142-150.
- Spector, D. L. (2001). "Nuclear domains." J Cell Sci **114**(Pt 16): 2891-3.
- Spector, D. L. (2006). "SnapShot: Cellular bodies." Cell **127**(5): 1071.
- Spilianakis, C. G. and R. A. Flavell (2004). "Long-range intrachromosomal interactions in the T helper type 2 cytokine locus." Nat Immunol **5**(10): 1017-27.
- Spolsky, C. and T. Uzzell (1984). "Natural interspecies transfer of mitochondrial DNA in amphibians." Proc Natl Acad Sci U S A **81**(18): 5802-5.
- Sproul, D., N. Gilbert, et al. (2005). "The role of chromatin structure in regulating the expression of clustered genes." Nat Rev Genet **6**(10): 775-81.
- Stadler, S., V. Schnapp, et al. (2004). "The architecture of chicken chromosome territories changes during differentiation." BMC Cell Biol **5**(1): 44.
- Stöck, M., D. K. Lamatsch, et al. (2002). "A bisexually reproducing all-triploid vertebrate." Nat Genet **30**(3): 325-8.
- Strachan, T. and A. P. Read (2005). "Molekulare Humangenetik." Elsevier GmbH, Spektrum Akademischer Verlag.
- Straight, A. F., W. F. Marshall, et al. (1997). "Mitosis in living budding yeast: anaphase A but no metaphase plate." Science **277**(5325): 574-8.
- Sumner, A. T., H. J. Evans, et al. (1973). "Mechanisms involved in the banding of chromosomes with quinacrine and Giemsa. I. The effects of fixation in methanol-acetic acid." Exp Cell Res **81**(1): 214-22.
- Taddei, A., F. Hediger, et al. (2004). "The function of nuclear architecture: a genetic approach." Annu Rev Genet **38**: 305-45.
- Takizawa, T., P. R. Gudla, et al. (2008). "Allele-specific nuclear positioning of the monoallelically expressed astrocyte marker GFAP." Genes Dev **22**(4): 489-98.
- Talbot, D., P. Collis, et al. (1989). "A dominant control region from the human beta-globin locus conferring integration site-independent gene expression." Nature **338**(6213): 352-5.

- Tanabe, H., S. Muller, et al. (2002). "Evolutionary conservation of chromosome territory arrangements in cell nuclei from higher primates." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(7): 4424-9.
- Telenius, H., A. H. Pelmeur, et al. (1992). "Cytogenetic analysis by chromosome painting using DOP-PCR amplified flow-sorted chromosomes." Genes Chromosomes Cancer **4**(3): 257-63.
- Tsukamoto, T., N. Hashiguchi, et al. (2000). "Visualization of gene activity in living cells." Nat Cell Biol **2**(12): 871-8.
- Tumbar, T., G. Sudlow, et al. (1999). "Large-scale chromatin unfolding and remodeling induced by VP16 acidic activation domain." J Cell Biol **145**(7): 1341-54.
- Tumbar, T. and A. S. Belmont (2001). "Interphase movements of a DNA chromosome region modulated by VP16 transcriptional activator." Nat Cell Biol **3**(2): 134-9.
- van der Ploeg, M. (2000). "Cytochemical nucleic acid research during the twentieth century." Eur J Histochem **44**(1): 7-42.
- Venter, J. C., M. D. Adams, et al. (2001). "The sequence of the human genome." Science **291**(5507): 1304-51.
- Verschure, P. J., I. van Der Kraan, et al. (1999). "Spatial relationship between transcription sites and chromosome territories." J Cell Biol **147**(1): 13-24.
- Visser, A. E., F. Jaunin, et al. (2000). "High resolution analysis of interphase chromosome domains." J Cell Sci **113** (Pt 14): 2585-93.
- Volpi, E. V., E. Chevret, et al. (2000). "Large-scale chromatin organization of the major histocompatibility complex and other regions of human chromosome 6 and its response to interferon in interphase nuclei." J Cell Sci **113** (Pt 9): 1565-76.
- von Hase, J. (2002). Digitale Bildanalyse der radialen Verteilung von spezifischen Subregionen im Zellkern. Naturwissenschaftlich-Mathematische Gesamtfakultät Ruprecht-Karls-Universität.
- Waterston, R. H., K. Lindblad-Toh, et al. (2002). "Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome." Nature **420**(6915): 520-62.
- Weierich, C., A. Brero, et al. (2003). "Three-dimensional arrangements of centromeres and telomeres in nuclei of human and murine lymphocytes." Chromosome Res **11**(5): 485-502.
- Wiblin, A. E., W. Cui, et al. (2005). "Distinctive nuclear organisation of centromeres and regions involved in pluripotency in human embryonic stem cells." J Cell Sci **118**(Pt 17): 3861-8.
- Wienberg, J. (2005). "Fluorescence in situ hybridization to chromosomes as a tool to understand human and primate genome evolution." Cytogenet Genome Res **108**(1-3): 139-60.
- Wijers, E. R., C. Zijlstra, et al. (1993). "Rapid evolution of horse satellite DNA." Genomics **18**(1): 113-7.
- Williams, A. E. (2008). "Functional aspects of animal microRNAs." Cell Mol Life Sci **65**(4): 545-62.

- Williams, R. R., S. Broad, et al. (2002). "Subchromosomal positioning of the epidermal differentiation complex (EDC) in keratinocyte and lymphoblast interphase nuclei." Exp Cell Res **272**(2): 163-75.
- Williams, R. R., V. Azuara, et al. (2006). "Neural induction promotes large-scale chromatin reorganisation of the Mash1 locus." J Cell Sci **119**(Pt 1): 132-40.
- Woodfine, K., H. Fiegler, et al. (2004). "Replication timing of the human genome." Hum Mol Genet **13**(2): 191-202.
- Woods, G. L., K. L. White, et al. (2003). "A mule cloned from fetal cells by nuclear transfer." Science **301**(5636): 1063.
- Wurtele, H. and P. Chartrand (2006). "Genome-wide scanning of HoxB1-associated loci in mouse ES cells using an open-ended Chromosome Conformation Capture methodology." Chromosome Res **14**(5): 477-95.
- Xu, N., C. L. Tsai, et al. (2006). "Transient homologous chromosome pairing marks the onset of X inactivation." Science **311**(5764): 1149-52.
- Yang, F., B. Fu, et al. (2004). "Refined genome-wide comparative map of the domestic horse, donkey and human based on cross-species chromosome painting: insight into the occasional fertility of mules." Chromosome Res **12**(1): 65-76.
- Yokota, H., G. van den Engh, et al. (1995). "Evidence for the organization of chromatin in megabase pair-sized loops arranged along a random walk path in the human G0/G1 interphase nucleus." J Cell Biol **130**(6): 1239-49.
- Zink, D. and T. Cremer (1998). "Cell nucleus: chromosome dynamics in nuclei of living cells." Curr Biol **8**(9): R321-4.
- Zink, D., H. Bornfleth, et al. (1999). "Organization of early and late replicating DNA in human chromosome territories." Exp Cell Res **247**(1): 176-88.
- Zink, D., M. D. Amaral, et al. (2004). "Transcription-dependent spatial arrangements of CFTR and adjacent genes in human cell nuclei." J Cell Biol **166**(6): 815-25.
- Zinner, R., H. Albiez, et al. (2006). "Histone lysine methylation patterns in human cell types are arranged in distinct three-dimensional nuclear zones." Histochem Cell Biol **125**(1-2): 3-19.
- Zinner, R., K. Teller, et al. (2007). "Biochemistry meets nuclear architecture: Multicolor immuno-FISH for co-localization analysis of chromosome segments and differentially expressed gene loci with various histone methylations." Adv Enzyme Regul.

8 Danksagung

Zuallererst möchte ich mich bei **Prof. Dr. Thomas Cremer** dafür bedanken, dass ich meine Arbeit in seiner Arbeitsgruppe durchführen durfte. Seine vorurteilsfreie und aufgeschlossene Art spiegelte sich in der gesamten Arbeitsgruppe wider.

Ein besonderes Dankeschön gilt meinem Betreuer **PD. Dr. Steffen Dietzel**, der mir während der gesamten Arbeit in jeglicher Hinsicht mit Rat und Tat zur Seite stand. Er wurde nicht müde, neue Ideen einzubringen, behielt stets den Überblick bei Auswertungsmöglichkeiten aller Art und auch so manches Computerproblem wurde durch seine Hilfe gemeistert.

Bei **PD. Dr. Angelika Böttger** möchte ich mich ganz herzlich für die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Prof. Dr. Constanze Bonifer und ihrer Arbeitsgruppe in Leeds (UK) danke ich für die Gastfreundschaft und die Tricks und Tipps bei der Kultur und Transfektion von embryonalen Maus-Stammzellen. Auch **Dr. Timm Schroeder** danke ich für die Durchführung zahlreicher Transfektionsexperimente in seinem Labor an der GSF in Neuherberg, sowie die Einführung in die Differenzierung von Stammzellen und die Bereitstellung von Materialien. Ein Dankeschön auch an **Dr. Christian Lanctôt**, der mir nicht nur bei stammzellspezifischen Fragen eine Hilfe im Labor war.

Mein Diplomand **Alexander Mannes** und meine Praktikanten **Julia Merz** und **Andreas Mayer** führten für mich zahlreiche Versuche durch und haben somit maßgeblich zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen. **Simone Otten** und **Kourosh Zolghadr** arbeiteten zeitweise am gleichen Thema und ermöglichten gemeinsame Publikationen. Danke an alle.

Ein großes Dankeschön geht an alle meine langjährigen Mitstreiter: **Robert Mayer**, der stets neben mir saß und mich so manches Mal zum Lachen brachte. **Daniela Köhler**, die mir nicht nur ein Dach über dem Kopf gewährte und mich verkuppelte, sondern mir auch im Labor eine Hilfe war. Ebenso **Claudia Weierich**, die für fast alle Probleme eine Lösung hatte und deren (nicht nur kulinarischer) Einsatz für unsere Arbeitsgruppe nicht zu unterschätzen ist. Bei **Alexandra Kölbl** bedanke ich mich für den Shuttleservice und die Gespräche über equine Lebensgefährten. Vielen Dank auch an den restlichen Kern der Arbeitsgruppe: **Katrin Küpper**, **Kathrin Teller**, **Heiner Albiez** und **Roman Zinner**, sowie **Dr. Irina Solovei**, **Dr. Sandro Brero**, **Andreas Zunhammer**, meine Labornachbarn **Dr. Stefan Müller**, **Dr. Michaela Neusser** und **Florian Grasser** und meine neuen Zimmergenossen **Hilmar Strickfaden** und **Jens Nagel**. Sie und alle anderen Mitglieder der AG Cremer sorgten für ein tolles Arbeitsklima und eine positive Stimmung, mit der sich so manche Schwierigkeit im Forscheralltag leichter meistern ließ.

Bei **Dr. Marion Cremer** möchte ich mich für das Lesen meiner Arbeit, sowie konstruktive Verbesserungsvorschläge bedanken. Danke auch an **Dr. Jürgen Peters**, der einen Teil der statistischen Auswertung übernahm und damit zur erfolgreichen Publikation eines Teils meiner Arbeit beitrug.

Und „last but not least“ ein riesengroßes Dankeschön an meine Familie, die mir das alles erst ermöglicht hat, ganz besonders an meinen Bruder **Peter Hepperger**, der mir bei Computerproblemen aller Art stets mit bewundernswerter Geduld zur Seite stand. Ebenso an meinen Freund **Martin Karmann**, ohne dessen moralische und praktische Unterstützung v.a. bei der Bildbearbeitung, ich des öfteren verzweifelt wäre.

9 Curriculum vitae

Persönliche Daten:

Name: Claudia Susanne Hepperger
Geburtsdatum: 18.06.1976
Geburtsort: Gräfelting
Familienstand: ledig

Schulbildung:

1983 - 1987 Grundschule in Eichenau
1987 - 1989 Graf-Rasso Gymnasium in Fürstenfeldbruck
1989 - 1996 Bertolt-Brecht-Gymnasium in Pasing
1996 Abitur (Note 1,5)

Hochschulstudium:

Oktober 1996 - November 2002: Diplomstudium Biologie

Hauptfach: Humangenetik

Nebenfächer: Genetik, Zoologie, Landnutzungsplanung und Naturschutz
an der Ludwig-Maximilians-Universität München

Abschluss: Note 1,1 „sehr gut“

Freiwilliges Praktikum: Mai 2000 - Juli 2000

Tätigkeit als Waldführer im Nationalpark Bayerischer Wald

Diplomarbeit: November 2001 - November 2002; Institut für Anthropologie und Humangenetik

Thema: Untersuchung der Interphase-Chromosomenorganisation mittels lac Operator / lac
Repressor - GFP Markierung

Promotion: Juli 2003 bis dato

Thema: Untersuchungen zur dreidimensionalen Organisation des Genoms in Säugerzellkernen
an der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität

Auslandsaufenthalt: Februar 2004, vierwöchiger Forschungsaufenthalt in der Arbeitsgruppe von
Dr. Constanze Bonifer an der University of Leeds (UK)

10 Publikationen

Dietzel, S., K. Zolghadr, **C. Hepperger**, A. Belmont (2004): "Differential large-scale chromatin compaction and intranuclear positioning of transcribed versus non-transcribed transgene arrays containing β -globin regulatory sequences." Journal of Cell Science 117: 4603-4614.

Teile dieser Arbeit sind in folgenden Publikationen veröffentlicht:

Hepperger, C., S. Otten, J. v. Hase, S. Dietzel (2006): "Preservation of large-scale chromatin structure in FISH experiments." Chromosoma 116: 117-133.

Hepperger, C., A. Mannes, J. Merz, J. Peters, S. Dietzel (2008): "Three-dimensional positioning of genes in mouse cell nuclei." (Chromosoma, DOI: 10.1007/s00412-008-0168-2)

Hepperger, C., A. Mayer, S. Dietzel: "Separation of parental genomes in mammalian cell nuclei." (in Vorbereitung)

Weitere Publikationen:

Hepperger, C., K. Zolghadr, A. Belmont, T. Cremer, S. Dietzel: "Large-scale chromatin unfolding after activation of a β -globin gene construct in mouse erythroleukemia (MEL) cells."; Poster und Vortrag auf der 5. DGZ-Nachwuchswissenschaftler-Tagung "Zellkernarchitektur" in Jena; 25.-27.09.2003.

Hepperger, C., K. Zolghadr, S. Dietzel, T. Cremer: "Changes in chromatin structure after transgene activation."; Poster auf der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie in Berlin; 24. - 27.03.2004.

Hepperger, C., A. Mannes, S. Dietzel: "Distribution of active and inactive gene regions in mouse cell nuclei."; Poster bei der "1st Chromatin Summer School" des Transregio 5 in Nördlingen; 19.-22.09.2006.

Hepperger, C. und Kölbl, A.: "Fluorescence In Situ Hybridization"; Vortrag im SFB 684 Methods Seminar in Herrsching; 31.05.-01.06.2007.

Hepperger, C., A. Mannes, S. Dietzel: "The nuclear positioning of mouse gene loci correlates with genomic properties but not with gene density"; Poster auf dem 2nd Transregio 5 Symposium in München; 13.-15.09.2007.

11 Ehrenwörtliche Versicherung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur mit den angegebenen Quellen und Materialien durchgeführt habe.

Ferner bestätige ich, dass ich vor dieser Arbeit keine anderen Promotionsversuche unternommen habe. Dies ist meine erste und einzige Dissertation.

Claudia Hepperger

München, den 28.07.08